

TARTU ÜLIKOOL
Bioloogia-geograafiateaduskond
Molekulaar- ja rakubioloogia instituut
Rakubioloogia õppetool

Kersti Jääger

CD43 MÕJU UURIMINE RAKKUDE KASVULE

Magistritöö

Juhendajad: Lilian Kadaja-Saarepuu, *Ph.D.*
Prof. Toivo Maimets, *Ph.D.*

TARTU 2007

Sisukord

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS.....	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1. CD43	5
1.1. CD43 valk	5
1.2. CD43 ekspressiooni regulatsioon	6
1.3. CD43 funktsioonid	7
1.4. CD43 ekspressioon kasvajakudedes	10
1.5. β -kateniini signaalirada kasvajates	11
1.6. CD43 ja β -kateniin	12
2. TUUMORSUPRESSOR p53	14
2.1. p53 üldiseloomustus	14
2.2. p53 valgu ehitus	14
2.3. p53 regulatsioon	16
2.4. p53 funktsioonid.....	18
2.5. ARF-p53 signaalirada	21
EKSPERIMENTAALNE OSA.....	24
1. TÖÖ EESMÄRGID	24
2. MATERJAL JA METOODIKA	25
2.1. Plasmiidid.....	25
2.2. siRNA oligonukleotiidid	25
2.3. Rakud ja nende kultiveerimine	26
2.4. Rakkude transfekteerimine.....	27
2.5. Totaalse RNA eraldamine	27
2.6. Kvantitatiivne pöördtranskriptaasi PCR (Q-RT-PCR)	28
2.7. <i>Western Blot</i>	29
2.8. Läbivoolutsütomeetria.....	30
2.9. Fraktsioneerimine.....	30
2.10. Lutsiferaasi reporteranalüüs	31
2.11. Kolooniade formeerumise katse	31
2.12. Rakkude kasvukõvera moodustamine	32
2.13. Apoptoosi määramine	32
3. TULEMUSED.....	33
3.1. CD43 üleekspressioon soodustab kolooniade moodustumist rakkudes, kus puudub kas ARF või p53.....	33
3.2. CD43 üleekspressioon indutseerib ARF/p53-sõltuva apoptoosiraja.	34
3.3. CD43 üleekspressioon soodustab rakkude jagunemist ARF või p53 ekspressiooni puudumise korral.	34
3.4. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamine siRNA-ga inimese rakuliinides.	36
3.5. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamine vähendab kasvajakuliinide kolooniade moodustumist	38
3.6. CD43 ja β -kateniini koosmõju kolooniade formeerumisele.....	39
3.7. p53 aktiveerimiseks CD43 poolt on vajalik β -kateniini olemasolu.	40
3.8. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamine mõjutab β -kateniini valgu hulka tuumas.	41
3.9. Tcf/Lef-sõltuva transkriptsiooni aktiveerimiseks on vajalik nii β -kateniini kui ka CD43 olemasolu.	42
4. ARUTELU	44
KOKKUVÕTE.....	50
SUMMARY	51
KASUTATUD KIRJANDUS	52
TÄNUAVALDUSED	60

Kasutatud lühendid

AP-1 – *activator protein 1*
Apaf -1 – *apoptotic protease activating factor*
APC – *adenomatous polyposis coli*
ARF – *alternative reading frame*
ATM – *ataxia-telangiectasia mutated*
ATR – *ATM-Rad3-related*
Bax – *bcl-2-associated protein X*
Bcl-2 – *B-cell lymphoma protein 2*
Bid – *BH3-interacting domain death agonist*
CD43ct – *CD43 cytoplasmic domain*
CDK – *cyclin dependent kinase*
cDNA – *complementary DNA*
EDTA – *ethylene-diamine tetraacetic acid*
FITC – *fluorescein-isothiocyanate*
GAPDH – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GSK3 β – *glycogen synthetase kinase 3 β*
HDM2 – *human double minute 2*
HIPK – *homeodomain-interacting protein kinase*
HPRT – *hypoxanthine-ribosyltransferase*
INK4a – *inhibitor of the CDK4/6*
JNK – *c-Jun-NH₂ terminal kinase*
kDa – *kilodalton*
mAb – *monoclonal antibody*
MAPK – *mitogen activated protein kinase*
MDM2 – *murine double minute 2*
MEF – *mouse embryonic fibroblast*
NF-AT – *nuclear factors of activated T-cells*
NF κ B – *nuclear factor κ B*
NLS – *nuclear localization signal*
PBS – *phosphate buffered saline*
PCAF – *p300/CBP binding protein*
PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*
PEI – *polyethylenimine*
PKB – *protein kinase B*
PKC – *protein kinase C*
pRB – *retinoblastoma protein*
PUMA – *p53- upregulated mediator of apoptosis*
RNAi – *RNA interference*
SDS – *sodium dodecyl sulfate*
SH3 – *Src homology domain 3*
siRNA – *short interfering RNA*
STANK – *sialophorin tail-associated nuclear kinase*
SV40 – *simian virus 40*
Tcf/Lef – *T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*
wt – *wild type*

Geeni ja valgu nimetuste tähistamine töös: geen – *kursiivis*, valk – *püstises kirjas*

Sissejuhatatus

Rakkude normaalseks funktsioneerimiseks on oluline, et nende kasv oleks õigesti reguleeritud. Onkogeenid põhjustavad ülemääraseid kasvusignaale, võimaldades jaguneda rakkudel valel ajal ja vales kohas, sõltumata välistest signaalidest. Seetõttu on onkogeensete signaaliradade aktiveerumine üheks eeltingimuseks kasvaja tekkel. Lisaks esineb kasvajarakkudes mitmeid muutusi, mida põhjustavad liialt kõrgel või madalal tasemel ekspresseeritavate geenide produktid.

Kuigi transmembraanset molekuli CD43 peeti pikka aega leukotsüütide-spetsiifiliseks markeriks, koguneb järjest enam vihjeid selle kohta, et ta võiks käituda soodustava faktorina mitte-verepäritolu kasvajate tekkes. Nimelt ekspresseerub CD43 kõrgel tasemel erinevates kasvajakuliinides ja -kudedes, sealhulgas käärsoole adenoomides, aga mitte normaalsetes kooloni rakkudes. Samuti on näidatud tema seos erinevate signaaliradade komponentidega, mis rakkude elulemust või kasvu mõjutavad.

Tavatingimustes aktiveeritakse rakus vastusena onkogeensele stressile tuumorsupressor ARF kaudu tuumorsupressor p53 (so ARF/p53 rada). p53 käitub transkriptsioonifaktorina, reguleerides mitmete geenide ekspressiooni ja indutseerides seeläbi erinevaid nn stressi vastusprogramme, nende hulgas rakutsükli blokki ja apoptoosi. p53 geenimutatsioone või funktsiooni kadu esineb ligikaudu pooltes inimese kasvajates, mis viitab tema olulisusele kasvaja tekke takistamisel. Kuna vastusena CD43 üleekspressioonile aktiveeritakse ARF/p53-rada, toetab see hüpoteesi CD43 potentsiaalse rolli kohta kasvu soodustamisel ning seeläbi kasvaja tekkel.

Nendest andmetest ja spekulatsioonidest tulenevalt vaadati käesolevas töös, kuidas mõjutab CD43 rakkude jagunemist sõltuvalt ARF/p53 kontekstist ning kas CD43 mõju rakkude jagunemisele võiks olla seotud onkogeense β -kateniini-rajaga, mille deregulatsioon on käärsoolekasvajate tekke üheks peamiseks põhjuseks. Kirjanduse osa on sissejuhatuseks eksperimentaalsele tööle ning annab ülevaate CD43 ekspressioonist ja funktsioonidest ning p53-st ja tema funktsioonidest. Mõlema osa juures on lühike ülevaade β -kateniinist ja selle rollist kasvajate tekkel. Osa antud töös esitatud tulemustest on käsikirja vormis avaldamisel.

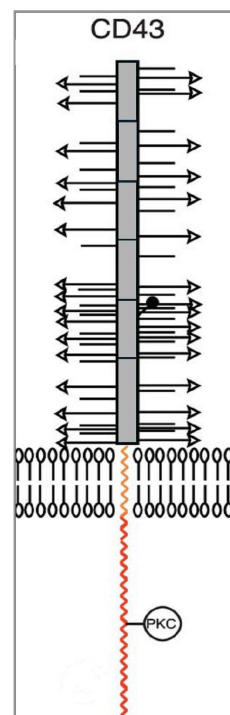
KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. CD43

1.1. CD43 valk

CD43, tuntud ka leukosialiini ja sialoforiinina, on enamikes vererakkudes ja vereloomes eellasrakkudes ekspresseeritav peamine transmembraanne glükoproteiin (Carlsson & Fukuda, 1986). Tema ekspressioon on rakutüübiti erinevate mehhanismide kaudu rangelt reguleeritud, mis viitab CD43 olulisele rollile immuunsüsteemi tasakaalus hoidmisel. CD43 funktsioonide hulka kuuluvad rakkude adhesiooni, anti-adhesiooni, aktivatsiooni, diferentseerumise, jagunemise ja apoptoosi reguleerimine (Ostberg *et al.*, 1998; Rosenstein *et al.*, 1999). Kuigi algselt peeti CD43 vaid vererakkude markermolekuliks, ekspresseeritakse teda ka paljudes mitte-verepäritolu kasvajakudedes, sealhulgas käärsoole adenoomides ja mõnedes käärsoole kartsinoomides (Amano *et al.*, 2001; Baeckstrom *et al.*, 1995; Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2002; Pimenidou *et al.*, 2004; Santamaria *et al.*, 1996; Sikut *et al.*, 1999).

CD43 valgu võib jagada kolmeks osaks: ekstratsellulaarne (koosneb 235 aminohappejäägist), transmembraanne (23 aminohappejääki) ja tsütoplasmaatiline (123 aminohappejääki) domeen (Joonis 1). Ekstratsellulaarne osa sarnaneb mutsiinidele ja on paljudest seriini- ja treoniinjääkidest O-glükosüleeritud (1/3 aminohappejääkidest).



Joonis 1. CD43 valgumolekuli skemaatiline struktuur. Hallid ristkülikud – mutsiini-domeenid; horisontaalsed jooned ja nooled – O-seoselised suhkrujäägid; must täpp – N-seoseline suhkrujääk; PKC – üks proteiinkinaas C fosforüleerimiskohtadest (Drew *et al.*, 2005 järgi).

Seetõttu omandab CD43 oma aminoterminaalses alas suure negatiivse laengu (suhkruahelad lõpevad negatiivselt laetud siaalhappejäägiga) ja moodustab rakupinnal kaugele väljaulatava struktuuri (Cyster *et al.*, 1991). CD43 sisaldab oma ekstratsellulaarses osas ka ühte N-glükosüleerimise kohta (Cyster *et al.*, 1990). CD43 rakutüübiti erinevast glükosüleeritusest tulenevalt ekspresseeritakse vererakkudes CD43 kahe isovormina: 115 kD ja 130 kD (Carlsson & Fukuda, 1986). Kooloni kartsinoomi rakuliinis COLO205 on CD43 molekulmass suurem kui 200 kDa (Baeckstrom, 1997).

Valgu transmembraanne domeen sarnaneb teistele integraalsetele molekulidele ent tsütoplasmaatiline (karboksüterminaalne) domeen on CD43-l tavapärasest pikem, koosnedes 123-st aminohappejäägist. Roti, inimese ja hiire DNA järjestuste võrdluse tulemusena on leitud, et erinevalt CD43 ekstratsellulaarsest domeenist on valgu transmembraanne ja tsütoplasmaatiline domeen kõrgelt konserveerunud (Pallant *et al.*, 1989). Tsütoplasmaatiline domeen sisaldab mitmeid fosforüleerimiskohti, mida fosforüleerib teiste hulgas proteiinkinaas C (PKC), ja proliini-rikast SH3-siduvat konsensusjärjestust (*Src homology 3*), mille kaudu osaleb CD43 signaaliülekanes (Cyster *et al.*, 1990; Pedraza-Alva *et al.*, 1996). Lisaks interakteerub CD43 tsütoplasmaatilise osa kaudu tsütoskeleti konserveerunud struktuuridega (Serrador *et al.*, 1998; Yonemura *et al.*, 1998).

1.2. CD43 ekspressiooni regulatsioon

CD43 ekspressiooni reguleeritakse nii transkriptsiooni tasandil, membraanis jaotumise kui ka proteolüütilise lõikamise ja varjestamise kaudu (Andersson *et al.*, 2005; Bazil & Strominger, 1993; Da Silva *et al.*, 2002; Kudo, 1998; Weber *et al.*, 1997; Yonemura *et al.*, 1993).

CD43 geen asub 16. kromosoomis ja sisaldab kahte eksonit. Ainuke intron asub CD43 mRNA 5'-mitte-transleeritavas alas ning seega kodeerib valku vaid teine ekson (Cyster *et al.*, 1990). CD43 transkriptsiooni basaalsel tasemel reguleerib transkriptsioonifaktor Sp1, mis seondub GGGTGG motiiviga kordustele geeni 5' otsaga külgnevas alas (Kudo & Fukuda, 1994). CD43 koespetsiifiline ekspressioon tagatakse CD43 promootori konstitutiivse metüleerimise kaudu, mis lülitab CD43 geeni välja seda mitte-ekspresseerivates rakkudes (Kudo & Fukuda, 1995). CD43 erinev ekspressioon lümfotsüütide pinnal sõltuvalt raku arengujärgust (kas puhkav või aktiveeritud rakk) ja rakutüübist on reguleeritud geeni ekspressiooni tasandil tuumafaktorite PyRo1 ja PyRo2

kaudu, mis seostuvad CD43 promootoris asuva *in vitro* nukleas S1-tundliku DNA piirkonnaga ja soodustavad CD43 promootori aktivatsiooni (Farokhzad *et al.*, 2000). Rakkude aktivatsiooni käigus (rakuliinid K562 ja U937) väheneb CD43 mRNA tase ning CD43 geeni promootori transkriptsiooniline aktiivsus. Seda repressiooni vahendavad tuumavalgud hnRNP-K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) ja Pura (Da Silva *et al.*, 2002; Shelley *et al.*, 2001).

Lisaks geeniekspressiooni reguleerimisele, saab mõjutada CD43 pinnaekspressiooni tema ekstratsellulaarse domeeni eemaldamise kaudu. Kirjeldatud on metalloproteaaside ja seriinproteaaside vahendatud CD43 ekstratsellulaarse osa lõikamist membraanis (Bazil & Strominger, 1993; Weber *et al.*, 1997). Vereplasmas esineb palju CD43 lahustunud kujul, nimega galaktoglükoproteiin (Galgp), mis arvatakse olevat tekkinud 130 kD isovormist proteolüütilise lõikamise tulemusena (Schmid *et al.*, 1992).

1.3. CD43 funktsioonid

CD43 valgu struktuuri omapära (tema pikk ekstratsellulaarne domeen ulatub kaugemale kui teised pinnavalgud) ning tema molekulide rohke tõttu leukotsüütide pinnal on CD43 üks esimestest molekulidest, mis teiste rakkudega kokku puutub. On leitud, et CD43 osaleb rakkude adhesioonil nii proadhesiivse kui ka antiadhesiivse molekulina (Ostberg *et al.*, 1998).

Anti-adhesioon. CD43 rolli anti-adhesioonil on näidatud nii *in vitro* kui ka *in vivo* katsetes, kus CD43 ekspressioon vähendas rakkude adhesiooni (Ardman *et al.*, 1992; Ostberg *et al.*, 1996). Sellega on kooskõlas uurimuse tulemused, kus leiti, et CD43 ekspressiooni mahasurumine T-lümfotsüütidel suurendas nende adhesioonivõimet (Manjunath *et al.*, 1993; Stockton *et al.*, 1998). CD43 sellist mõju seletatakse valgu ekstratsellulaarse domeeniga, mille rohked negatiivselt laetud siaalhappejäägid toimivad tõukuva barjäärina ning mille füsioloogiliseks funktsiooniks arvatakse olevat puhkavate vererakkude hoidmine tsirkulatsioonis adhesiooni takistamise kaudu (Ardman *et al.*, 1992; Fukuda, 1991; Manjunath *et al.*, 1995). On näidatud, et CD43 erinevatest glükovormidest vererakkude pinnal käitub anti-adhesiivse valguna vaid 130 kD CD43 (Fukuoka *et al.*, 2000). Lisaks füüsilise barjääri efektile arvatakse, et CD43 eemaldamine T-raku ja antigeeni esitleva raku immunoloogilisest

sünapsist toimub CD43 tsütoplasmaatilise domeeni ja rakusiseste protsesside kaudu (Tong *et al.*, 2004).

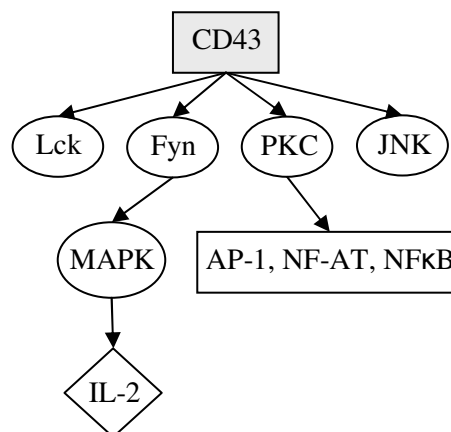
Adhesioon. CD43 võib vahendada pro-adhesiooni kahe üldise mehhanismi abil. Üheks võimaluseks on CD43 otsene osalus rakkudevahelise kontakti loomisel. Nimelt on näidatud, et CD43 seostub retseptoritega nagu ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule type 1*), E-selektiin, galektiin-1 ja MHC klass I molekulid (*major histocompatibility complex*)(Baum *et al.*, 1995; Rosenstein *et al.*, 1991; Stockl *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). ICAM-1 ja CD43 interaktsioon raku pinnal on oluline CD43 ekspresseerivate kasvajarakkude adhereerumisel kõhukelme mesoteeli rakkudega, mis võiks soodustada metastaaside teket (Ziprin *et al.*, 2004). CD43 funktsioneerib aktiveeritud T-rakkude pinnal E-selektiini ligandina, soodustades rakkude adhesiooni ja rullumist kunstlikes tingimustes (Matsumoto *et al.*, 2005). Hiljuti näidati, et CD43 käitub E-selektiini ligandina ka *in vivo*, soodustades T-rakkude migreerumist põletikukoldesse (Matsumoto *et al.*, 2007). Teiseks võib CD43 seostumine retseptorile indutseerida valgu tsütoplasmaatilise domeeni kaudu signaali ülekandeahela, mis lõpuks viib rakkude agregatsioonini (Ostberg *et al.*, 1998; Walker & Green, 1999).

Rakkude jagunemine. Lisaks rakkude adhesiooni reguleerimisele, osaleb CD43 mitmetes rakkude jagunemisega seotud signaaliradades, mille eest vastutab eelkõige valgu tavapärasest pikem tsütoplasmaatiline domeen. CD43 ise katalüütilist aktiivsust ei oma ent käitub kui transmembraanne retseptor, soodustades signaaliülekandekomplekside teket vastusena ligandi seondumisele. CD43-st lähtuvate signaaliahelate uurimiseks on kasutatud erinevaid monoklonaalseid antikehi (mAb), mis mimikeerivad tegelike ligandide seostumist CD43-le. Näiteks on leitud, et mAb L10 seondumine CD43-ga soodustab T-rakkude ja monotsüütide jagunemist PKC-vahendatud signaaliraja kaudu (Piller *et al.*, 1989; Silverman *et al.*, 1989). CD43-vahendatud signaalid indutseerivad transkriptsioonifaktorite AP-1, NF-AT ja NFκB aktivatsiooni T-rakkudes, mis arvatakse olevat samuti seotud PKC-st lähtuva signaaliahelaga (Santana *et al.*, 2000). Lisaks on näidatud, et CD43 seostub Fyn kinaasi SH3 domeeniga oma proliini-rikka osa kaudu (Pedraza-Alva *et al.*, 1996). Selle tulemusena käivitub signaaliahel MAP kinaasi osalusel ning indutseeritakse erinevate geenide, sealhulgas *interleukiin-2* ekspressioon (Pedraza-Alva *et al.*, 1998)(Tabel 1). On näidatud, et CD43 osaleb ka JNK signaaliülekandeahela aktiveerimises (Mattioli *et al.*, 2004). Th2 rakuliinis näidati, et CD43 sidumine antikehaga R2/60 indutseerib nende rakkude jagunemist funktsionaalse türosiinkinaasi Lck sõltuvalt, millega kaasneb

adapervalgu Shc ja CD43 fosforüleerimine tsütoplasmaatilises osas (Fernandez-Cabezudo *et al.*, 2004).

Tabel 1. Vasakpoolses tabeliosas on toodud CD43-ga seonduvad valgud, koos nende üldiste funktsioonidega ja parempoolsel skeemil on ülevaade CD43 poolt aktiveeritud signaaliülekandeahelatest vererakkudes.

Seostuv valk	Üldine funktsioon
Fyn	T rakkude aktivatsioon, signaaliülekanne
Lck	T rakkude aktivatsioon, signaaliülekanne
HIPK2	Apoptoos, transkriptsiooni reguleerimine
β -kateniin	Multifunktsionaalne; adhesioon, signaaliülekanne
Daxx	Apoptoos, transkriptsiooni repressioon



CD43 kõrgeenenud ja pidev ekspressioon transgeensete hiirte küpsetes B-lümfotsüütides (CD43 neil tavaliselt ei esine) pikendab B-lümfotsüütide eluiga *in vitro* ja põhjustab hiirtel põrna suurenemist. Seda seletatakse rakkude vähenenud tundlikkusega apoptoosi suhtes (Dragone *et al.*, 1995). Rakkude elulemuse kasvu CD43 ekspressiooni korral nähti ka B-raku lümfoomi kultuuris vastusena seerumi eemaldamisele (Misawa *et al.*, 1996). Lisaks on CD43 apoptoosi inhibeerivat mõju näidatud töös, kus CD43 üleekspressioon T-mälurakkudes blokeeris Fas-vahendatud surmasignaali ülekande (He & Bevan, 1999).

Mõni aeg tagasi kloneeriti CD43 tsütoplasmaatilise osaga spetsiifiliselt seonduv seriin/treoniinkinaas STANK (*sialophorin tail-associated nuclear kinase*), mis lokaliseerub nii tsütoplasmas kui ka tuumas ja mille kaudu võiks CD43-st alguse saav rakkude kasvu soodustav signaal liikuda membraanist tuuma (Wang *et al.*, 2000). STANK on peaaegu identne seriin/treoniinkinaas HIPK2-ga (*homeodomain-interacting protein kinase*), mis vastusena DNA kahjustusele seondub ja fosforüleerib p53 positsioonist Ser46 ning indutseerib p53-sõltuvat apoptoosi (Di Stefano *et al.*, 2004). CD43 intratsellulaarse osaga seostuvad ka onkogeenne β -kateniin ja apoptoosi

regulaator Daxx, olles potentsiaalsed CD43 signaalide vahendajad (Andersson *et al.*, 2004; Cermak *et al.*, 2002).

Apoptoos. Lisaks eelnevatele näidetele CD43 rollist rakkude jagunemise soodustajana on teada, et CD43 võib vahendada ka apoptootilisi signaale. On leitud, et jagunevate hematopoeetiliste eellasrakkude ja müeloidset-tüüpi eellasrakkude seostumine plastikule kinnitatud CD43-vastase mAb-ga MEM-59 indutseerib nendes rakkudes apoptoosi, millega kaasneb AP-1 DNA-ga seondumise aktiivsuse langus (Bazil *et al.*, 1995; Cermak *et al.*, 2002). Sama efekti on nähtud Jurkat T rakkudega, kus kasutati mAb J393 ning mille käigus langes NF κ B DNA-ga seondumise aktiivsus (Brown *et al.*, 1996). Antikeha K06 indutseerib samuti CD43-ga seondumise kaudu pro-apoptootilise raja, soodustades Fas molekulide agregatsiooni raku pinnal ja kaspaaside aktivatsiooni (Kim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2004).

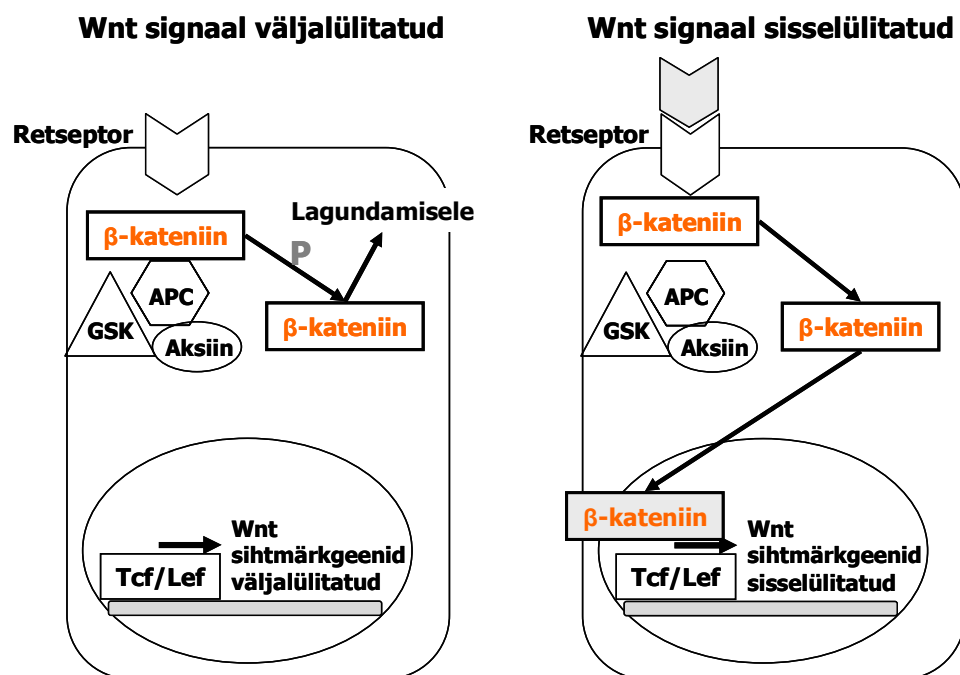
Nendest tulemustest selgub, et CD43-vahendatud signaalirajad võivad viia väga erineva või isegi vastandliku bioloogilise väljundini, sõltuvalt nii rakutüübist kui spetsiifilisest keskkonnast. Kuigi enamik andmeid CD43 funktsioonide kohta on saadud leukotsüütide uurimise tulemusena, on järjest enam tekkinud huvi CD43 rolli vastu mitte-verepäritolu kasvajarakkudes, kus erinevalt normaalsetest rakkudest ekspresseeritakse CD43 kõrgel tasemel.

1.4. CD43 ekspressioon kasvajarakkudes

CD43 ekspressiooni väljaspool hematopoeetilist päritolu rakuliine näidati esmakordselt 1995-ndal aastal, kui uuriti käärsoole kartsinoomi rakuliini COLO205 (Baeckstrom *et al.*, 1995). CD43 olemasolu tõestati nii mRNA kui ka valgu tasemel. Hiljem on leitud, et CD43 ekspresseeritakse ka teistes, mitte-hematopoeetilist päritolu rakuliinides, mis näitab, et CD43 võib omada üldisemaid funktsioone, mis ei piirdu vaid spetsiifiliselt leukotsüütidega (Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2002; Santamaria *et al.*, 1996).

Põhjus, miks varem eranditult leukotsüüdi markeriks peetud CD43 molekuli väljaspool vereloomerakke ei leitud, võib tuleneda katsetes kasutatud CD43-vastaste antikehade spetsiifikast valgu glükosüleeritud vormide suhtes. CD43 ekstratsellulaarne domeen on vereloomerakkudes ja mitte-vererakkudes erinevalt glükosüleeritud ning seega hematopoeetiliste rakkude CD43-vastased antikehad enamasti CD43 mitte-hematopoeetiliste rakkude pinnal ära ei tunne (Baeckstrom, 1997; Remold-O'Donnell *et*

al., 1987). Hiljem tehti uued CD43 vastased antikehad ja leiti, et CD43 ekspresseeritakse sageli käärsoole adenoomides ja mõnedes kartsinoomides aga mitte normaalsetes kooloni rakkudes (Sikut *et al.*, 1999; Pimenidou *et al.*, 2004; Sikut *et al.*, 1997). Samuti on näidatud, et CD43 üleekspressioon põhjustab ARF-sõltuvalt funktsionaalse p53 valgu akumulereerumist ning indutseerib p53 kaudu rakkude apoptoosi (Kadaja *et al.*, 2004). Need on esialgsed, kuid olulised vihjed selle kohta, et CD43 võiks käituda rakkudes mitogeense stiimulina ja seeläbi soodustada kasvaja teket.



Joonis 2. Ülevaade Wnt/β-kateniini signaalirajast (Peifer & Polakis, 2000 järgi).

1.5. β-kateniini signaalirada kasvaja

β-kateniin on multifunktsionaalne adaptervalk, osaledes E-kadheriin-vahendatud rakk-rakk kontaktide tekkel ja mitmetes aktiveeritud signaaliradades, sealhulgas Wnt, Akt/PKB, NFκB ja p53 rajas (Damalas *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2002; Fukumoto *et al.*, 2001; Willert & Nusse, 1998). Tema funktsiooni on kõige paremini kirjeldatud kanoonilises Wnt rajas, kus vastusena Wnt signaalile akumulereerub β-kateniin tuuma, kus ta seostub Tcf/Lef (*T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*) perekonna transkriptsioonifaktoritega, et reguleerida geeniekspressiooni. Sihtmärkide hulka

kuuluvad rakkude jagunemist stimuleerivad geenid nagu *c-Myc*, *tsükliin D*, *c-Jun* (He *et al.*, 1998; Mann *et al.*, 1999; Tetsu & McCormick, 1999) jt. Wnt/ β -kateniin rada omab keskset rolli embrüonaalses arengus ning häired selles on seotud paljude haigustega, nende seas ka vähi tekkega (Logan & Nusse, 2004; Lustig & Behrens, 2003; Moon *et al.*, 2004; Polakis, 2000). Isegi enam kui 90% käärsoolekasvaja patsientidest kannavad aktiveerivat mutatsiooni selles rajas, kas siis *loss-of-function* mutatsiooni *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) või *Aksiini* geenis või *gain-of-function* mutatsiooni β -kateniinis endas. Hiljuti näidati, et β -kateniini signaalirada on oluline mitmete kudede (nahk, veri ja soolestik) tüvi- või eellasrakkude säilitamisel ja taastootmisel (Beachy *et al.*, 2004; Reya *et al.*, 2003).

Vaba β -kateniini hulk tsütoplasmas on rangelt reguleeritud (Joonis 2). Wnt signaali puudumisel viiakse β -kateniin nn lagundamiskompleksi, mis koosneb tuumorsuppressoritest Aksiin ja APC ning kinaasidest CK1 (*Casein kinase 1*) ja GSK3 β (*Glycogen synthetase kinase 3 β*), mis fosforüleerivad β -kateniini N-terminaalses alas. Selle tulemusena viiakse β -kateniin proteasoomsesse lagundamisratta (Fearnhead *et al.*, 2001; Morin, 1999). Wnt signaal aga inhibeerib GSK3 β aktiivsuse, põhjustades β -kateniini stabiliseerimise. Eespool nimetatud mutatsioonid selles rajas takistavad β -kateniini fosforüleerimist ja seega lagundamist, mistõttu tingivad aktiivse β -kateniini akumulendumise ja tuuma liikumise välistest signaalidest sõltumatult. Lisaks on kirjeldatud p53-vahendatud β -kateniini lagundamist, kus mängib rolli interaktsioon p53 märklaua Siah-1 ja APC vahel (Iwai *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2001). Need andmed kinnitavad β -kateniini rolli onkogeeninina, mille taseme deregulatsioon on aluseks kasvajate tekkele paljudes kudedes (Giles *et al.*, 2003; Lustig & Behrens, 2003; Polakis, 2000).

1.6. CD43 ja β -kateniin

CD43 näol on tegemist transmembraanse molekuliga ent mitte-verepäritolu kasvajakarakuliinis COLO205 esineb CD43 pigem rakusiseselt ning suudab lokaliseeruda ka tuumas (Sikut *et al.*, 1999). Sellist esialgu kummalist nähtust saab seletada tuuma lokalisatsiooni signaali olemasoluga (NLS) CD43 tsütoplasmaatilises domeenis (CD43ct), mille kaudu on CD43 võimeline tuuma liikuma (Andersson *et al.*, 2004). CD43 puhul on kirjeldatud ka reguleeritud intramembraanset proteolüüsi (RIP) protsessi, mis on iseloomulik membraanivalkudele, kus tsütoplasmaatiline domeen

lõigatakse membraanist ära, et osaleda signaaliülekandes. See lõikamine on eeldatavalt γ -sekretaas kompleksist sõltuv, millele eelneb metalloproteaasne lõikamine ekstratsellulaarses domeenis. Kuna ekstratsellulaarse lõikamise produkt on substraadiks γ -sekretaas kompleksile, siis on CD43 puhul kirjeldatav kahe fragmendi, CD43-CTF (*cytoplasmatic tail fragment*) ja CD43-ICD (*intracellular domain*) esinemine (Andersson *et al.*, 2005). Kuigi CD43-ICD pole tuumas tema madala stabiilsuse tõttu suudetud detekteerida, võiks see protsess selgitada CD43-st lähtuvate signaalide jõudmist tuuma, et reguleerida geeniekspressiooni ja seeläbi mõjutada kasvaja teket.

CD43 funktsiooni uurimisel tuumas leiti, et CD43ct seostub nii tuumas kui ka tsütoplasmas β -kateniiniga, mille tulemusena tõuseb β -kateniini mitootiliste sihtmärkgeenide *c-Myc* ja *tsükliin D1* ekspressioon (Andersson *et al.*, 2004). *c-Myc* on transkriptsioonifaktor ja reguleerib omakorda paljude proliferatsiooniga seotud geenide ekspressiooni ning indutseerib p53-sõltuvat apoptoosi (Dang *et al.*, 1999).

Praeguseks on kirjeldatud CD43 ebanormaalselt kõrge ekspressioon erinevates inimese kasvajakuliinides, lisaks käärsoole kasvaja algfaasis (adenoomides) aga mitte normaalsetes kooloni rakkudes. Samuti on teada β -kateniini osa käärsoole kasvaja tekkes Wnt-raja kaudu. Lähtudes nendest andmetest ja faktist, et CD43 ja β -kateniin omavahel interakteeruvad, on CD43 ja β -kateniini signaaliraja võimaliku seose kindlaks tegemine atraktiivseks küsimuseks, mille lahendamine võiks anda vihjeid CD43 potentsaalse rolli kohta kasvajate tekkel.

2. Tuumorsupressor p53

2.1. p53 üldiseloomustus

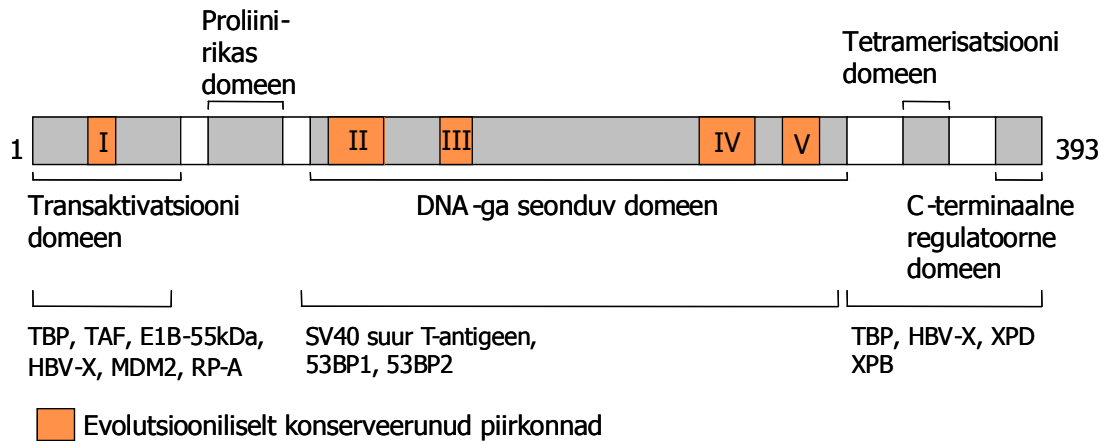
p53 valk avastati algselt kui rakuline 53 kDa molekulmassiga fosfoproteiin, mis seondus SV40 viiruse (*Simian Virus 40*) suure T antigeeniga (Linzer & Levine, 1979). Kuna selle valgu tase oli transformeerunud rakkudes kõrge ja ta ekspresseerus koos teiste onkogeenidega, siis arvati, et p53 on samuti onkogeen (DeLeo *et al.*, 1979). Hiljem leiti, et esialgsetes katsetes kasutatud p53 cDNA sisaldas mutatsioone (Hinds *et al.*, 1989). Metsik-tüüpi (wt) p53 on võimeline transformeerunud rakkudes üleekspresseerituna rakkude kasvu pidurdama ja inhibeerima rakkude transformatsiooni mitmete onkogeenide ekspressiooni korral (Baker *et al.*, 1990; Eliyahu *et al.*, 1989; Finlay *et al.*, 1989). Seetõttu nimetati p53 edaspidi tuumorsupressoriks.

Inimese *p53* geen on umbes 20 kiloaluspaari pikkune ja asub 17. kromosoomi lühikeses õlas (17p13). Hiire *p53* geen asub 11. kromosoomis (Czosnek *et al.*, 1984). *p53* geen koosneb 10-st intronist ja 11-st eksonist, millest esimene on mittekodeeriv (Soussi *et al.*, 1990).

Tuumorsupressor *p53* geeni inaktivatsiooni esineb umbes 50% inimeste kasvajates (Soussi, 1997). p53 on rakutsükli kontrollpunkti regulaator, säilitades genoomse stabiilsuse erinevate keskkonnast tulenevate ja rakusiseste stressitingimuste korral nagu hüpoksia, DNA kahjustus, ribonukleotiidide reservi muutus ja onkogeenide aktivatsioon (Appella & Anderson, 2001; Vogelstein *et al.*, 2000). Normaalses tingimustes on p53 lühikese elueaga tuumavalk, kuid stressisignaalid viivad p53 kiire stabiliseerimise ja aktivatsioonini läbi post-translatsiooniliste modifikatsioonide nagu fosforüleerimine ja atsetüleerimine (Appella & Anderson, 2001). Aktiivne p53 pidurdab rakkude kasvu transaktiveerides geene, mis käivitavad rakutsükli peatumise või apoptoosi (Levine, 1997).

2.2. p53 valgu ehitus

p53 valk on evolutsiooniliselt konserveerunud (Soussi *et al.*, 1990) ja sisaldab viit kõrgelt konserveerunud piirkonda I-V, mis asuvad aminohapete vahemikes 13-23, 117-142, 171-181, 234-250 ja 270-286. Neid peetakse p53 funktsioonide seisukohalt ülioluliseks (Soussi *et al.*, 1990; Soussi & May, 1996).



Joonis 3. Inimese p53 valgu piirkonnad ja nendega seonduvad valgud (Somasundaram, 2000 järgi).

Inimese p53 valk koosneb 393 aminohappejäägist ja valgu võib jaotada kolmeks põhiliseks osaks (Joonis 3):

Aminotermiinus asub transaktivatsiooni domeen (aminohappejäägid 1-42), millega seonduvad basaalse transkriptsiooni masinavärgi osad TBP (*TATA box binding protein*) ja TFIID komponendid TAF-id (*TBP-associated factors*) ning üheaheelalise DNA-ga seonduv valk RP-A (Dutta *et al.*, 1993; Lu & Levine, 1995). Selle osaga valgust seostuvad veel adenoviiruse E1B-55kDa valk, hepatiit B viiruse X valk ja MDM2 valk (inimese HDM2), mis inhibeerivad p53 võimet transkriptsiooni indutseerida (Oliner *et al.*, 1993). Lisaks transaktivatsioonivõimele, võib p53 paljudelt rakulistelt ja viiruslikelt geenidelt transkriptsiooni represseerida (Ginsberg *et al.*, 1991). N-terminaalses regioonis leidub ka proliini-rikas domeen (aminohappejäägid 63-97), mis sisaldab viies korduses SH3 siduvat motiivi PXXP (P = proliin, X = ükskõik milline teine aminohappejääk) ja on seetõttu tähtis signaali ülekandes (Walker & Levine, 1996).

p53 valgu **keskosas** (aminohappejäägid 102-292), kus paiknevad neli konserveerunud piirkonda viiest (II-V), asub ka p53 DNA siduv nn südamik domeen, mis tunneb ära ja seostub oma konsensusjärjestusele 5'-PuPuPu-C(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (Pu = puriin; Py = pürimidiin). See 10-aluspaari pikkune järjestus esineb sihtmärk-DNA-l kahe koopiana, mis on teineteisest eraldatud 0-13 nukleotiidiga (El-Deiry *et al.*, 1992). Lisaks seondub südamik domeen SV40 suure T antigeeni ja rakuliste valkudega 53BP1 ja 53BP2 (*binding protein*) (Gorina & Pavletich, 1996; Jenkins *et al.*, 1988). 80-90% kasvajatest leitud mutatsioonidest asuvad just p53 selles piirkonnas.

Karboksüterminuses paikneb *linker*-järjestus (aminohappejäägid 300-318), millele järgneb tetramerisatsiooni domeen (aminohappejäägid 323-356) ja reguleeriv domeen (aminohappejäägid 363-393). Tetramerisatsiooni-domeeni kaudu moodustab p53 tetrameeri, mis on vajalik p53 efektiivseks transaktiivsuseks *in vivo* ja p53-vahendatud kasvu mahasurumiseks vähirakuliinides (Jeffrey *et al.*, 1995). Reguleeriv domeen toimib p53 järjestus-spetsiifilise DNA-ga seondumise negatiivse regulaatorina (Shaw *et al.*, 1996). On näidatud, et selle osa seondumine mingi muu valgu piirkonnaga lukustab p53 tetrameeri sellisesse konformatsiooni, millises p53 pole võimeline DNA-ga seostuma (Hupp & Lane, 1994). p53 aktiivsus korreleerub imetajarakkudes C-terminaalse ala fosforüülimise, atsetüleerimise, glükosüleerimise ja proteolüütilise eemaldamisega (Ko & Prives, 1996; Ababneh *et al.*, 2001; Okorokov & Milner, 1997; Shaw *et al.*, 1996). Karboksüterminuses on leitud kolm tuuma lokaliseerimise signaali NLS1, NLS2 ja NLS3, mille muteerumisel muutub p53 valgu lokaliseerimine rakus (Shaulsky *et al.*, 1990). On näidatud ka paljude viiruslike ja rakuliste valkude seostumist C-terminaalse alaga, nende hulgas hepatiit B viiruse X valk, mis inaktiveerib p53, ning *in vitro* helikaasid XPD ja XPB (TFIIH alaühikud) ning TBP (Horikoshi *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995).

2.3. p53 regulatsioon

p53 on ülimalt efektiivne raku kasvu inhibiitor, indutseerides rakutsükli peatumist ja/või apoptoosi vastavalt keskkonnale ja rakutüübile (Brookes *et al.*, 2002). p53 aktiivsus peab olema rangelt reguleeritud, et saaks toimuda nii normaalsete rakkude jagunemine kui ka kasvaja supresseerimine. Peamised p53 aktiivsuse kontrollmehhanismid toimivad p53 valgu tasemel. p53 valk allub mitmetele post-translatsioonilistele modifikatsioonidele ja seostub paljude rakuliste valkudega, mis osalevad p53 stabiilsuse, rakusisese lokaliseerimise ja aktiivsuse regulatsioonis (Appella, 2001; Prives & Hall, 1999).

Normaalselt jagunevates rakkudes on p53 valgu tase madal tema kiire degradeerimise tõttu (Brookes *et al.*, 2002). Põhiline p53 stabiilsuse reguleerija on MDM2 valk, mis funktsioneerib kui ubiquitiin-ligaas, vahendades p53 ubiquitineerimist ja lagundamist proteasoomses rajas (Kubbutat *et al.*, 1997). Samas on MDM2 p53 transkriptsiooniline sihtmärk, mistõttu moodustub negatiivne tagasiside, kus p53 kontrollib omaenda regulaatori ekspressiooni (Jones *et al.*, 1995; Montes de Oca Luna

et al., 1995). Normaalses tingimustes reguleerib p53 ka seriin/treoniinkinaas Akt/PKB, mis MDM2 fosforüleerimise ja tema tuumas paiknemise soodustamise kaudu võimendab p53 lagundamist (Mayo & Donner, 2002). Lisaks blokeerivad p53 aktiivsust ka mitmed teised signaaliradade komponendid nagu Src ja c-Jun (Schreiber *et al.*, 1999).

p53 aktivatsioon vastusena stressi-tingimustele toimub p53 valgu mitmete modifikatsioonide kaudu nagu fosforüleerimine, atsetüleerimine, o-glükosüleerimine, sumoüleerimine ja ribosüleerimine. p53 fosforüleeritakse nii valgu amino- kui ka karboksüterminaalsetes piirkondades. N-terminaalsete alade fosforüleerimine, mida vahendavad sellised kinaasid nagu Chk1, Chk2, ATM ja ATR (Appella, 2001), takistab seostumist MDM2-ga ja soodustab seeläbi p53 akumulustumist ja transkriptsioonilist aktiivsust. Onkogeense Ras ekspressioon indutseerib p53 fosforüleerimist positsioonides Ser33 ja Ser46 MAPK-sõltuvalt, milleks on vajalik eelnev Ser15 fosforüleerimine (Bulavin *et al.*, 1999). p53 atsetüleerimist viivad läbi histooni atsetülaasid p300/CBP ja PCAF, mis seonduvad p53 N-terminaalse osaga ja atsetüleerivad C-terminaalseid alasid (Ababneh *et al.*, 2001). Ülejäänud modifikatsioonid: o-glükosüleerimine, sumoüleerimine ja ribosüleerimine, leiavad aset p53 karboksüterminaalsetes osades ja suurendavad p53 transkriptsiooni aktivatsiooni võimet (Gostissa *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 1996).

Seni kõige paremini kirjeldatud p53 stabiliseerimise mehhanism, kus ei ole otseselt vajalik p53 fosforüleerimine, on seotud tuumorsupressorvalgu ARF ekspressiooniga, mis vahendab p53 vastust onkogeenide kontrollimatu aktivatsiooni korral (Chin *et al.*, 1998; Eischen *et al.*, 1999; Kamijo *et al.*, 1998; Stott *et al.*, 1998). ARF seostub otseselt MDM2-ga, inhibeerides nii tema ubikvitiin-ligaasist aktiivsust kui ka hoides MDM2 tuumakeses, takistades nii MDM2-vahendatud p53 degradatsiooni (Honda & Yasuda, 1999; Eischen *et al.*, 1999).

Kuna p53 üheks peamiseks funktsiooniks on transkriptsiooni reguleerimine, siis on vajalik tema lokaliseerumine tuumas. On näidatud, et p53 kasutab tuuma liikumiseks mikrotuubulite võrgustikku ning seondub düneiiniga (Giannakakou *et al.*, 2002; Giannakakou *et al.*, 2000). Lisaks vahendavad p53 tuuma liikumist valgu C-terminaalses osas paiknevad NLS järjestused. Tuuma eksporti mõjutab suuresti MDM2 valk, mis funktsioneerib p53 ubikvitiin ligaasina, suunates p53 tsütoplasmasse, kus ta proteasoomses rajas lagundatakse (Freedman & Levine, 1999).

2.4. p53 funktsioonid

Peamised p53 vahendatud rakulised vastused mitmetele stressisignaalidele on rakutsükli peatamine ja apoptoosi indutseerimine, mille kaudu p53 takistab kahjustatud DNA-ga või ebanormaalselt jagunevate rakkude paljunemist ning hoiab ära kasvaja tekke. Lisaks osaleb p53 DNA reparatsioonil ja rekombinatsioonil ning rakkude vananemisel. p53 funktsioonide täitmisel mängib olulisimat rolli valgu võime aktiveerida transkriptsiooni sihtmärkgeenidelt, mis vastavaid vastuseid esile kutsuvad.

Rakutsükli peatamine. p21 on peamine p53-sõltuva rakutsüklibloki vahendaja, inhibeerides S-faasi üleminekuks vajaliku tsükliin D ja CDK4/6 (*cyclin dependent kinase*) kompleksi teket (Xiong *et al.*, 1993). Vastav kompleks fosforüleerib retinoblastoomi valku (pRb), mille tulemusena vabanevad pRb-E2F seosest E2F perekonna transkriptsioonifaktorid, mis aktiveerivad rakutsükli jätkumiseks vajalike geenide transkriptsiooni. p21 takistab kinaaside inhibiitorina pRb fosforüleerimist, mistõttu E2F hoitakse kompleksis kinni ning rakutsükkel peatub G1 faasis. Lisaks seondub p21 PCNA-ga (*proliferating cell nuclear antigen*), mille kaudu blokeeritakse rakutsükkel kas G1 või G2 faasis (Cayrol *et al.*, 1998). p21 üleekspressioon takistab inimese kooloni kasvajakarakudes p53-sõltuvat apoptoosi ja soodustab rakkude vananemist, mis näitab, et p21 võib käituda p53-vahendatud apoptoosi inhibiitorina (Abdulkarim *et al.*, 2002).

Teiseks oluliseks geeniks, mille transkriptsiooni p53 aktiveerib ja mis viib G1 faasi peatamiseni, on *GADD45 (growth arrest & DNA damage)* (Kastan *et al.*, 1992). See geen kodeerib tuumavalku, mis PCNA-ga seostudes takistab rakkude sisenemist S-faasi (Smith *et al.*, 1994). GADD45 inhibeerib ka G2/M üleminekut, takistades cdc2 ja tsükliin B interaktsiooni (Zhan *et al.*, 1999).

Apoptoos. Üks kõige olulisemaid p53 funktsioone tuumorsupressorina on võime indutseerida apoptoosi. Esimesed andmed selle kohta, et p53 suudab apoptoosi kontrollida on pärit aastast 1991, mil *p53*-negatiivsesse kasvajakuliini viidi eksogeenne *p53*, mis indutseeris nendes rakkudes apoptoosi (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Hiljem näidati, et sama suudab teha ka endogeenne p53 (Clarke *et al.*, 1993).

Apoptoos ehk raku programmeeritud surm on rangelt reguleeritud protsess, mis võib toimuda kahe peamise raja kaudu (Fridman & Lowe, 2003). Välimine ehk rakupinnaretseptoritelt lähtuv rada aktiveeritakse vastava ligandi seostumisel nn surmaretseptorile. Sisemises rajas on keskne roll mitokondri välismembraani

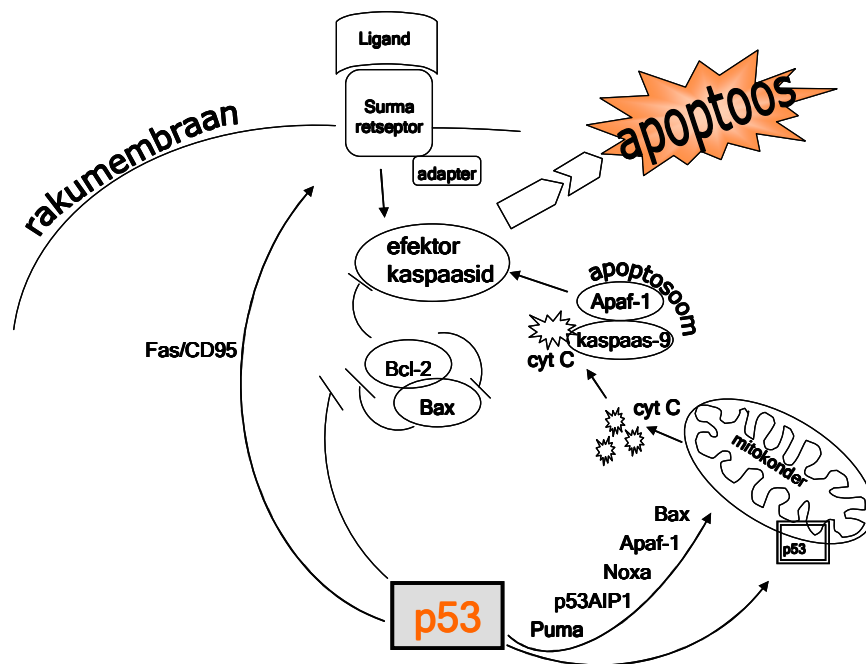
permeabiliseerimisel, mille tulemusena vabanevad mitokondri membraanidevahelisest ruumist olulised apoptoosi tekitavad faktorid nagu tsütokroom c ja AIF (*Apoptosis Inducing Factor*). Vabanenud tsütokroom c moodustab kompleksis initsiaator-kaspaasi kaspaas-9 ja Apaf-1-ga (*apoptotic protease activating factor*) apoptosoomi, mis lõikab ja aktiveerib effektor-kaspaase (Zamzami & Kroemer, 2003). Apoptoosi tulemuseks on DNA degradatsioon, kromatiini kondenseerumine ja membraaniga ümbritsetud vesiikulite tekkimine, mille pinnale eksponeeritud fosfolipiid fosfatidüülseriin on nn ärasöömis-signaaliks makrofaagidele ja teistele fagotsüteerivatele rakkudele (Fridman & Lowe, 2003).

Mitmed andmed näitavad, et p53-vahendatud apoptoos käib peamiselt läbi sisemise apoptoosiraja (Baldus *et al.*, 2001; Soengas *et al.*, 1999)(Joonis 4). p53 indutseerib apoptoosi, aktiveerides Bcl-2 perekonna proapoptootiliste valkude ekspressiooni nagu Bax, Puma, Noxa ja Bid (Abdel-Fattah *et al.*, 2000; Miyashita *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 2001; Sax *et al.*, 2002). Nende valkude üldine funktsioon seisneb selles, et seondudes Bcl-2 perekonna antiapoptootiliste valkudega takistavad nad nende funktsioneerimist mitokondris ning soodustavad apoptoosi käivitavate valkude vabanemist mitokondrist ja kaspaaside aktiveerimist. Lisaks apoptoosi induktoritele, aktiveerib p53 ka mitmete efektormolekulide sealhulgas Apaf-1 transkriptsiooni (Moroni *et al.*, 2001).

p53 reguleerib osaliselt ka välimist apoptoosirada, kuigi selle kohta on andmeid vähem. Siiski on teada, et p53 aktiveerib otseselt nii Fas/CD95 kui ka FasL kodeerivate geenide transkriptsiooni (Maecker *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 1998).

Väljaspool eelnimetatud apoptoosiradasid indutseerib p53 ka p53DINP1 (*p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1*) ja p53AIP1 (*p53 apoptosis-inducing protein 1*) valkude ekspressiooni. p53DINP1 osaleb p53 fosforüleerimises positsioonist Ser46, mis aktiveerib p53AIP1 transkriptsiooni p53 poolt. p53AIP1 on aga üleekspresseerituna võimeline indutseerima raku surma mitmetes kasvajakuliinides (Fridman & Lowe, 2003).

Lisaks transkriptsiooni aktivatsioonile võib p53 põhjustada apoptoosi mitmete rakkude kasvu ja ellujäämist soodustavate geenide transrepressiooni kaudu. p53 inhibeerib mitokondri membraanis lokaliseeruva anti-apoptootilise valgu Bcl-2 transkriptsiooni, mille tulemusena suureneb mitokondris pro-apoptootiliste valkude osakaal ja indutseeritakse apoptoos (Miyashita *et al.*, 1994). Teine p53 poolt repressseeritud geen *Survivin* kuulub apoptoosi inhibeerijate perekonda. Mitmetes



Joonis 4. Ülevaade p53 rollist apoptoosi indutseerimisel.

inimese kasvajaates on *p53* geeni mutatsioonidest tulenevalt Survivin tihti üleekspressioneeritud (Hoffman *et al.*, 2002).

Viimased andmed näitavad, et *p53* on võimeline indutseerima apoptoosi ka DNA-ga seondumise ja transkriptsiooni aktivatsiooni võimest sõltumatult. On näidatud, et stressitingimustes akumulereerub *p53* mitokondrisse, millele järgneb tsütokroom c vabanemine ja kaspaaside aktivatsioon (Mihara *et al.*, 2003). See toimub tõenäoliselt *p53* otsese seondumise kaudu Bcl-2 perekonna anti-apoptootiliste valkudega, mille tulemusena vabaneb apoptoosi soodustav Bax inhibeerivast kompleksist (Chipuk 2004; Mihara *et al.*, 2003).

Kas rakutsükli blokk või apoptoos? *p53* poolt indutseeritud bioloogilise vastuse raku tasandil määrab ära valgu poolt aktiveeritud geenide kogum, mis sõltub nii rakutüübist, stressi stiimulist kui ka selle tugevusest (Fridman & Lowe, 2003). Näiteks gamma-kiirgus indutseerib fibroblastides *p53*-sõltuvalt G1 faasi blokki, samas kui tümotsüüdid lähevad sama stiimuli mõjul *p53*-sõltuvasse apoptoosi (Lowe *et al.*, 1993). Rakulise vastuse sõltuvust stiimulist näitavad andmed, et E1A indutseerib MEF-s (*mouse embryonic fibroblasts*) *p53*-sõltuvat apoptoosi, ent Ras mõjul samad rakud vananevad enneaegselt *p53*-sõltuvalt (Serrano *et al.*, 1997). Mõlemal juhul on vajalik tuumorsupressori ARF olemasolu (de Stanchina *et al.*, 1998).

Viimasel ajal on leitud, et p53 poolt indutseeritud vastus sõltub suurel määral transkriptsiooni kofaktoritest, millega valk seostub. Erilist tähelepanu on pööratud ASPP (*apoptosis stimulating protein of p53*) valkudele, mis seostuvad p53 DNA seondumisdomeeniga ja soodustavad p53-sõltuvat apoptoosi (Brookes *et al.*, 2002). Seega võib vastuse määramisel mängida olulist rolli kofaktorite olemasolu ja regulatsioon. Lisaks sõltub aktiveeritavate geenide muster ka p53 enda postranslatsioonilistest modifikatsioonidest. p53 fosforüleerimist positsioonist Ser46 seostatakse eelkõige apoptoosi indutseerimise võimega, seda ei peeta oluliseks p53 stabiilsuse reguleerimisel (Brookes *et al.*, 2002).

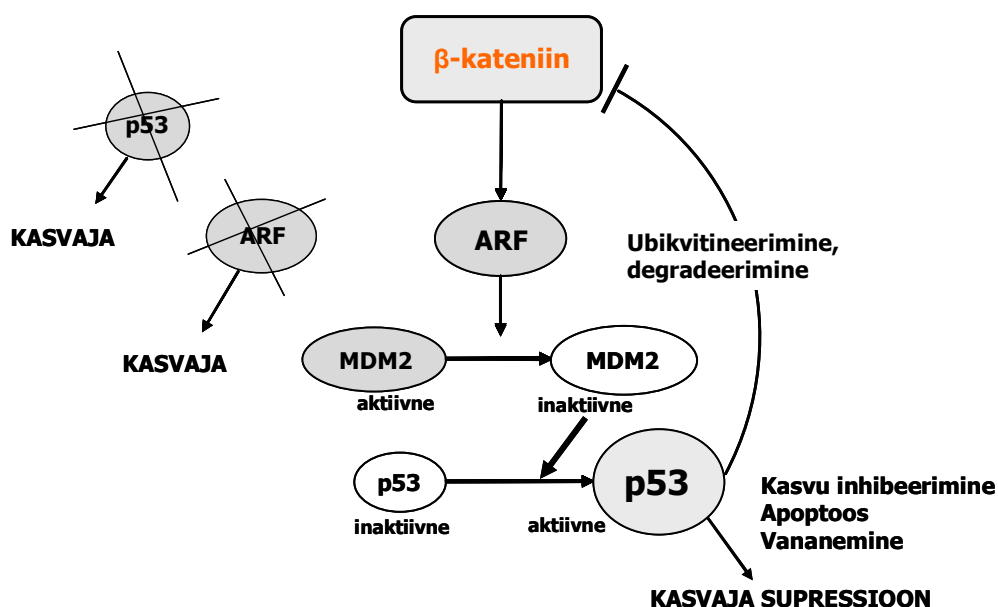
2.5. ARF-p53 signaalirada

Üheks paljudest p53 aktiveerivatest stressi-signaalist on onkogeenide kontrollimatu aktivatsioon. Mitmed uurimused on näidanud, et erinevalt DNA kahjustuse signaaliradadest, on selles signaali ülekandeahelas oluline roll tuumorsupressor valgul ARF (Bates *et al.*, 1998). ARF kodeeritakse *INK4a/ARF* lookuse poolt, mis on vähirakkudes p53 järel teine enim mutatsioone ja deletsioone sisaldav DNA piirkond (Sherr, 1998). Sama lookus kodeerib ka teist tuumorsupressorvalku p16^{INK4a}, mis on tsükliin-D-sõltuvate kinaaside inhibiitor, takistades seeläbi pRb valgu fosforüleerimist ja rakkude üleminekut rakutsükli S-faasi (Sharpless *et al.*, 2004).

Hiires on ARF 19kD-se molekulmassiga valk, koosnedes 169-st aminohappejäägist (p19ARF), inimeses on ARF molekulmassiks 14kD ning valk koosneb 132-st aminohappejäägist (p14ARF). Nad mõlemad on kõrgelt aluselised tuumavalgud, mis on võimelised üleekspressseerituna indutseerima rakutsükli G1- ja G2-faasi blokki nii p53-sõltuvalt kui ka p53-sõltumatult (Sherr *et al.*, 2005).

ARF-vahendatud p53 aktivatsioon leiab aset MDM2 inhibitsiooni kaudu ja see toimub mitmel tasandil (Sherr, 2006). ARF interakteerub MDM2 C-terminaalse alaga oma N-terminaalse osa kaudu, mille tulemusena on takistatud MDM2 tuuma eksport ja võime p53 ubikvitinüleerida (Honda & Yasuda, 1999; Midgley *et al.*, 2000). Kuna ARF lokaliseerub peamiselt tuumakestesse, mille eest vastutab p19ARF aminoterminalne osa ja p14ARF karbosüterminalne osa, siis inhibeerib ARF MDM2-te, hoides teda tuumakeses (Weber *et al.*, 1999).

ARF ekspressiooni reguleerivad E2F perekonna transkriptsioonifaktorid, mis lisaks ARF geeni aktiveerimisele soodustavad mitmete rakkude jagunemiseks vajalike geenide transkriptsiooni (Rowland *et al.*, 2002). Seeläbi kontrollib ARF jagunemissignaale, mis kindla kriitilise piiri ületamisel viivad rakud ARF kaudu p53-sõltuva kasvu pidurdumise või apoptoosini (Sherr & Weber, 2000). ARF indutseerivad mitmed rakkude kasvu stimuleerivad valgud nagu adenoviiruse E1A, c-Myc, onkogeenne Ras, v-Abl ja β -kateniin ning kutsuvad seeläbi esile p53 aktiivsuse (Bates *et al.*, 1998; Damalas *et al.*, 2001; de Stanchina *et al.*, 1998; Radfar *et al.*, 1998; Zindy *et al.*, 1998). Normaalses MEF-s suureneb tsükliin D1 kaudu E2F1-vahendatud ARF mRNA tase ja rakud vananevad, mida aga ei juhtu juhul kui rakkudes puudub kas ARF või p53 (Damalas *et al.*, 2001).



Joonis 5. ARF-p53 signaalirada onkogeense stressi korral β -kateniini näitel (Oren, 2003 järgi).

Joonisel 5 on toodud ARF/p53 signaaliraja aktiveerumine vastusena onkogeensele β -kateniinile. Dereguleeritud β -kateniin tõstab ARF mRNA taset ja selle kaudu kasvab ARF valgu hulk, mis seob MDM2-te. Selle tulemusena inhibeeritakse MDM2-vahendatud p53 degradeerimine, p53 stabiliseerub ja käivitub nn anti-proliferatiivne programm (Damalas *et al.*, 2001). Funktsionaalse p53 raja puudumise korral saab avalduda β -kateniini onkogeenne mõju, mis viib vähi tekkeni. Selline olukord inimese kasvajates on saavutatud kas p53 geeni mutatsioonide/deletsioonide kaudu või läbi ARF inaktiveerimise (Oren, 2003). Paljudes kasvajates ongi ARF geeni

promootor metüleeritud ja seega valku ei sünteesita (Esteller *et al.*, 2000). p53 moduleerib omakorda β -kateniini taset, soodustades selle ubiquitineerimist ja degradeerimist proteasoomses rajas. Seeläbi moodustub β -kateniini ja p53 vahel negatiivne tagasiside-regulatsioon (Harris & Levine, 2005).

Seega on kasvaja tekke ära hoidmisel vajalikud nii p53 kui ka ARF. Rakkude immortaliseerimine on võimalik vaid siis kui üks nendest valkudest on inaktiveeritud (Harvey *et al.*, 1993). Samuti on enamikes rakuliinides inaktiivne p53 või ARF (mitte mõlemad korraga), mis kinnitab nende valkude funktsioneerimist kattuvast rajas ning nende olulisust ebanormaalselt jagunevate rakkude kasvu takistamisel ja seega kasvaja tekke ärahoidmisel.

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärgid

Minu töö moodustab osa suuremast projektist, kus üheltpoolt uuritakse CD43 mõju rakkude jagunemisele ja elulemusele kasvajakudedes ning selle seost p53-raja aktivatsiooniga, ja teiselt poolt p53 mõju CD43 ekspressioonile nii transkriptsiooni kui ka valgustasandil. CD43 ebanormaalset kõrge ekspressioon erinevates kasvajakuliinides ja -kudedes, sealhulgas käärsoole adenoomides aga mitte normaalses koes, viitab CD43 potentsiaalsele rollile kasvaja tekkel (Santamaria *et al.*, 1996; Sikut *et al.*, 1997; Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2002; Pimenidou *et al.*, 2004). Tuumorsupressor p53 aktiveeritakse ARF kaudu vastusena onkogeensele stressile ning tema akumulereerumist on näidatud mitmete kasvaja algstaadiumides, nende hulgas ka käärsoole adenoomides (Mazars *et al.*, 1991). Mutatsioonid p53 geenis on täheldatavad kasvaja tekke hilisemas faasis. Meie töögrupp on seni näidanud, et CD43 üleekspressioon indutseerib funktsionaalselt aktiivse p53 akumulereerumise, milleks on vajalik ARF olemasolu (Kadaja *et al.*, 2004).

Peamised käärsoolekasvaja tekkepõhjused on häired Wnt-signaalirajas, mille tulemusena onkogeenset β -kateniini ei lagundata, ta akumulereerub tsütoplasmasse ja liigub tuuma, kus aktiveerib kasvaja tekkeks oluliste kasvu soodustavate geenide ekspressiooni (Behrens & Lustig, 2004). Seni on näidatud, et CD43 tsütoplasmaatilise osa seostub β -kateniiniga, ning soodustab selle sihtmärkgeenide ekspressiooni (Andersson *et al.*, 2004). See on esimeseks vihjeks CD43 potentsiaalse osaluse kohta Wnt-rajast, soodustades seeläbi kasvaja teket.

Nendest andmetest tulenevalt said minu töö eesmärkideks:

- Uurida p53 aktiveerumise bioloogilist tähtsust vastusena CD43 üleekspressioonile, kasutades erinevaid funktsionaalseid katseid nagu kolooniate formeerumine ning kasvukiiruse ja apoptoosi analüüs.
- Uurida β -kateniini ja CD43 signaaliradade omavahelist seost rakkude jagunemise soodustamisel ning p53-raja aktiveerimisel.

2. Materjal ja metoodika

2.1. Plasmiidid

Töös kasutatud vektorid olid: **tühi pCG** - sisaldab tsütomegaloviiruse (CMV) IE1 geeni promootorit ja SV40 replikatsiooni alguspunkti (*ori*); **p-EGFP-N1** – ekspresseerib parandatud spektriomadustega GFP valku (*Enhanced Green Fluorescent Protein*); kasutati transfektsiooni efektiivsuse määramiseks, mis kasutatud hiire ja inimese rakuliinide korral oli vastavalt 70-95%; **pQM-CD43** - kodeerib inimese *CD43*; sisaldab *CD43* C-terminuses veise papilloomiviiruse (BPV) transaktivaatorvalgu E2 epitoopi (*Quattromed*); **pC1-Neo- β -kateniin S33Y-mutant** - ekspresseerib inimese wt β -kateniinist stabiilsemat mutantset β -kateniini, mille 33. positsioonis olev seriin on asendatud türosiinijäägiga (saadud Dr. B. Vogelstein'ilt); **pCG-p53** – kodeerib inimese *p53*; **pCG-mARF** – kodeerib hiire *p19ARF* (algelt saadi Dr C. Sherr'ilt); **pCG-hARF** – kodeerib inimese *p14ARF* (algelt saadud K. Wiman'ilt Karolinska Instituudist); **pBabePuro** - tagab rakkude resistentsuse antibiootikumile puromütsiin (saadud M. Ustav'ilt); **TOPFlash** ja **FOPFlash** – reporterplasmiidid β -kateniin-sõltuva transkriptsiooni uurimiseks; sisaldavad β -kateniin/Tcf/Lef-sõltuvat promootorit ja sellele järgnevat lutsiferaasi kodeerivat ala. FOPFlash sisaldab promootoralas kolme mutatsiooni ja kasutati TOPFlash signaali normaliseerimiseks erinevates proovides (*Promega*); **CyclGprom-lutsiferaas** – reporterplasmiid *p53* transkriptsioonilise aktiivsuse uurimiseks; sisaldab *p53* märklaudgeeni *tsükliin G* promootorit koos lutsiferaasi kodeeriva alaga (saadud M. Oren'ilt).

Plasmiidide kogus oli katsetes järgmine: Tühi pCG, p-EGFP-N1, pQM-CD43 ja pC1-Neo- β -kateniin S33Y-mutant plasmiidi 3 μ g 35-mm Ø tassi kohta ning pCG-p53, pCG-mARF, pCG-hARF, pBabePuro, TOPFlash/FOPFlash ja CyclGprom-lutsiferaas plasmiidi 1 μ g 35-mm Ø tassi kohta.

2.2. siRNA oligonukleotiidid

RNA interferentsi katsetes kasutati lühikesi 21 nukleotiidipikkuseid valmissünteesitud RNA oligomeere (Tabel 2; *Ambion*). Negatiivse kontrollina kasutati mitte-spetsiifilisi siRNA (*short interfering*) oligomeere, mis ei tunne ära rakus mingisugust RNA järjestust (*Ambion*). siRNA transfektsiooni efektiivsuse määramiseks,

mis käesolevas töös kasutatud rakkude korral oli kuni 80%, kasutati mitte-spetsiifilisi siRNA oligomeere, mis olid märgistatud FITC-ga (*fluorescein-isothiocyanate*; *Invitrogen*). Katsetes kasutatud siRNA kogus 3µg 35-mm Ø tassi kohta oli eelnevalt optimeeritud.

Tabel 2. Töös kasutatud siRNA oligomeerid.

Sihthärg mRNA	siRNA oligomeerid	Tüüp	Sihthärgi asukoht
CD43	5'-GCAAACUCUCUAGGAUCCtt gtCGUUUGAGAGAUCCUAGGG-5'	sense antisense	2. ekson
β-kateniin	5'-GGUGGUGGUAAUAAGGCtt gtCCACCACCAAUAUCCGA-5'	sense antisense	5. ekson

2.3. Rakud ja nende kultiveerimine

Katsetes kasutati rakuliine ARF^{-/-}MEF (hiire embrüonaalsed fibroblastid), 10(1) (hiire embrüonaalsed fibroblastid), H1299 (inimese kopsukasvaja rakud), HCT116 (inimese käärsoolekasvaja rakud) ja COLO205 (inimese käärsoolekasvaja rakud) (Tabel 3). Rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, kuhu oli lisatud veise loote seerumit (FCS) lõppkontsentratsiooniga 10% ning antibiootikume penitsilliini 100 U/ml ja streptomütsiini 0,1 mg/ml. Kasvutemperatuur oli 37°C ning keskkond sisaldas 5% CO₂.

Tabel 3. Töös kasutatud rakuliinid ja nende geneetiline taust huvi all olevate valkude ekspressiooni suhtes (mut – mutantne; S-seriin; G-glütsiin; E-glutamaat; del-deletsioon).

	p53	ARF	β-kateniin	CD43
ARF ^{-/-} MEF	+	–	+	+
10(1)	–	+	+	+
H1299	–	+	+	+
HCT116	+	–	mut- S45-del	+
COLO205	mut - G266E	+	+	+

2.4. Rakkude transfekteeerimine

Rakke transfekteeeriti *in vitro* transfektsiooni reagentiga PEI (polüetüleenimiin, ExGen 500, *Fermentas*) vastavalt tootja protokollile. DNA/PEI koguste suhe oli optimeerimise tulemusena 8.

siRNA-de transfekteeerimiseks kasutati RNAiFect reagenti (*Qiagen*) kogusega 6µl:1µg siRNA oligonukleotiidide kohta. siRNA lahusele lisati sööde mahuni 100µl, segati ja seejärel lisati transfektsiooni reagent. 10 minuti pärast tilgutati lahus tassil söötmes kasvavatele rakkudele. Raskesti transfekteeeruvate COLO205 rakkude korral kasutati siRNA-de rakku viimiseks elektroporatsiooni meetodit pingel 220V mahtuvusega 1000 µF elektroporaatoril *Gene PulserTM* (*BioRad*). Elektroporatsiooni lahus sisaldas 4-mm Ø küveti kohta 250µl rakususpensiooni, Na-Bes puhvrit (pH 7,5) lõppkontsentratsiooniga 5mM, 50µg kandja-DNA-d (lõhe spermi DNA) ja vajalikku kogust siRNA oligomeere. Pärast elektroporatsiooni seisis rakud küvetis 30 minutit ning seejärel külvati nad 60-mm Ø koekultuuritassidele 4ml söötmesse. Rakke, milles vaadati siRNA-de efekti eksogeensete valkude ekspressioonile ja funktsioonile, transfekteeeriti esmalt siRNA-ga ja 24h hiljem vastavate DNA vektoritega. Rakud analüüsiti 48h peale siRNA transfektsiooni.

2.5. Totaalse RNA eraldamine

Rakud koguti ühelt 60-mm Ø tassilt proovi kohta 48h peale siRNA transfektsiooni 15ml tuubi ja fuugiti 200 x g 5 minutit 4°C juures. Supernatant aspireeriti ja rakud homogeniseeriti 400µl lahuses D (4M guanidiin isotiotsüanaat, 25mM Na-tsitraat, pH 7, 0.5% sarkosüül, 100mM β-merkaptotetanool). Rakulüsaadile lisati 50µl 2M Na-atsetaati (pH 4), 500µl fenooli ja 100µl kloroformi vahepealse põhjaliku segamisega. Peale 15 minutit jääl inkubeerimist tsentrifuugiti segu 10000 x g 10 minutit 4°C juures. Ülemine vesifaas RNA-ga tõsteti puhtasse tuubi ja lisati 250µl fenooli ja 250µl kloroformi vahepeal korralikult segades. Peale tsentrifuugimist 10 000 x g 10 minutit 4°C juures sadestati vesifaas 400µl isopropanooli lisamisega –20°C juures 20 minutit. RNA koguti tsentrifuugimisega maksimumpööretel 10 minutit 4°C juures. Supernatant eemaldati, RNA pesti 70% etanooliga ja tsentrifuugiti 5 minutit maksimumpööretel. Seejärel eemaldati supernatant, sade kuivatati ja RNA lahustati 50µl mQ vees.

2.6. Kvantitatiivne pöördtranskriptaasi PCR (Q-RT-PCR)

Eraldatud RNA hulk määrati Q-RT-PCR abil, kasutades Absolute Q-PCR SYBR Green Mix Kit'i (*Abgene*) ja 7900HT Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*) masinat koos kaasasoleva tarkvaraga järgmistes tingimustes: I etapp (48°C 30 minutit) pöörd-transkriptsiooni jaoks, II etapp (95°C 15 minutit) QPCR-Mix segu sees oleva polümeraasi aktiveerimiseks ja III etapp (95°C 15 sekundit > 60°C 1 minut, 40 tsüklit) cDNA amplifitseerimiseks.

20µl PCR segu 96-plaadi kannu kohta sisaldas 1/10 eelnevalt eraldatud RNA lahusest (5µl), 10µl 2x AbsoluteTM QPCR-Mix (*AbGene*), 500nM praimereid (*Proligo*), vett ja 5U revertaasi (*Amersham Biosciences*). Vältimaks võimalust, et reaktsiooni käigus amplifitseeritakse RNA lahusesse jäänud genoomset DNA-d, kasutati kontrollina segu ilma revertaasita, kus produkti ei tohiks tekkida. Saadud mRNA hulk erinevates proovides normaliseeriti GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase*) mRNA hulga järgi. Mitte-relevantseks kontrolliks oli inimese HPRT (*hypoxanthine-ribosyltransferase*) mRNA. Kasutatud praimerid on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Töös kasutatud praimerid.

	Järjestus	Tüüp
CD43	5'-AGTGCTGCGTCCTTATCAGC-3'	Pärisuunaline
	5'-GGCTCGCTAGTAGAGACCAA-3'	Vastassuunaline
β-kateniin	5'-AGTGCTGAAGGTGCTATCTGT-3'	Pärisuunaline
	5'-GACGTTGACTTGGATCTGTCA-3'	Vastassuunaline
GAPDH	5'-CTGGAAGATGGTGATGGGATT-3'	Pärisuunaline
	5'-ATGTTCCAATATGATTCCACCCA-3'	Vastassuunaline
HPRT	5'-AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG-3'	Pärisuunaline
	5'-GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3'	Vastassuunaline

Andmete analüüsil võrreldi erinevates proovides produkti tekke eksponentsiaalsesse faasi jäävaid Ct (*cycle threshold*) väärtusi ehk tsüklite arve, mille juures saavutati kindel signaali läviväärtus. See arv lahutati kokkuleppeliselt arvust 35 (35-Ct), mis kirjeldab tsüklite arvu, kus produkti teke on jõudnud kindlasti kõikides proovides platooni. Kuna igas tsüklis suureneb produkti hulk 2 korda, siis signaali detekteerimise hetkel on produkti hulk 2^{35-Ct} . Saadud väärtus erinevates proovides ühtlustati GAPDH produkti hulga järgi, mida peaks olema kõikides proovides võrdselt.

Selleks jagati uuritava proovi 2^{35-Ct} väärtus GAPDH 2^{35-Ct} väärtusega. Saadud tulemus kirjeldabki mRNA hulka uuritud proovides.

2.7. Western Blot

24 tundi peale PEI transfektsiooni eemaldati rakkudelt sööde, pesti 3 korda külma PBS-ga (*phosphate buffered saline*) ning lisati 0,5ml külma PBS ja koguti rakud kummispaatli abil *Eppendorf*i tuubidesse. Lisati veelkord 0,5ml PBS ja koguti ülejäänud rakud. Rakususpensiooni tsentrifuugiti 12 000 x g 15 sekundit. Seejärel aspireeriti supernatant ning rakud suspendeeriti 40µl lüüsipuhvris (150mM NaCl, 50mM TrisCl pH 8, 1% Triton X-100), millele oli lisatud 25x proteaaside inhibiitorite segu (*Roche Diagnostics*). Rakkude lüüsimine toimus 1 tund jääl. Seejärel fuugiti rakulüsaati 12 000 x g 5 minutit ning supernatant pipeteeriti uude tuubi.

Valgu hulk lüsaatides määrati Bradfordi reagentiga (*Sigma*)(Bradford, 1976). Võrdse valgu-hulgaga lüsaatidele lisati 6x SDS (*sodium dodecyl sulfate*) proovipuhvrit (0,125M TrisCl pH 6,8, 4% SDS, 10% 2-merkaptotetanool, 20% glütserool, 0,004% broomfenoolsinine) ning kuumutati 5 minutit 100°C juures.

Valgud lahutati elektroforeesil 8-15%-gradient-SDS-polüakrüülamiidgeelis. Enne ülekannet niisutati *Bio TraceTM* PVDF (*polyvinylidene difluoride*, *Gelman Laboratory*) filtrit metanoolis ja inkubeeriti koos geeliga 10 minutit ülekandepuhvris (48mM Tris, 39mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% metanool). Ülekanne toimus 30 minutit konstantsel pingel 25V firma *BIO-RAD Trans-Blot[®] Semi-Dry Transfer Cell* aparaadiga. Pärast ülekannet blokeeriti filter 5% lõssipulbri lahuses (+0,05% Tween 20 PBS-s) 4°C juures üleöö.

Järgmisel päeval inkubeeriti filtrit toatemperatuuril 1 tund primaarsete antikehadega 5% lõssipulbrilahuses. Kasutatud antikehad: **CD43** - CD43 tsütoplasmaatilise domeeni vastane antikeha 4D2 (hübriidoomi lahjendamata supernatant)(Sikut *et al.*, 1999); **β-kateniin** – kommersiaalne antikeha lõppkontsentratsiooniga 0,5µg/ml (*BD Biosciences Pharmingen*); **p53** – fosforüleerimistundlik p53-Ser15 antikeha (lõppkontsentratsioon 2µg/ml; *Cell Signaling*); **β-aktiin** – kommersiaalne antikeha AC-15 (lahjendus 1:20 000; *Abcam*).

Peale primaarsete antikehadega inkubeerimist pesti filtrit pesulahusega (0,05% Tween 20 PBS-s) 3x7 minutit loksutil. Sekundaarse antikehana kasutati p53-Ser15 korral küüliku IgG (immuunoglobuliin) vastast biotinüleeritud antikeha

(lõppkontsentratsioon 0,99µg/ml; *Dako*) 5% lõssipulbrilahuses. Seejärel inkubeeriti filtrit streptavidiiniga konjugeeritud aluselise fosfataasi (lahjendus 1:1000; *Amersham*) 5% lõssipulbrilahuses 30 minutit 37°C juures. CD43, β -kateniini ja aktiini ekspressiooni detekteerimiseks kasutati hiire IgG vastast aluselise fosfataasi või mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud sekundaarset antikeha (*LabAs Ltd*), millega inkubeeriti filtrit 30 minutit 37°C juures. Järgnes juba eelnevalt kirjeldatud pesemine. Tulemused visualiseeriti vastavalt kas NBT (*nitro blue tetrazolium*) 50 mg/ml ja BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) 50 mg/ml lahusega AP (*alkaline phosphatase*) puhvris (100mM Tris pH 9,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) või ECL+ Kit-ga tootja protokoll järgi (*Amersham*).

2.8. Lävivoolutsütomeetria

CD43 ja β -kateniini ekspressiooni määramiseks koguti COLO205 rakud trüpsiniseerides 15ml tuubi, fikseeriti 70% etanoolis 10 minutit -20°C juures ja pesti PBS-Tween 1% BSA lahuses. Rakke inkubeeriti ülalnimetatud primaarsete antikehade ja negatiivse kontrollina hiire p53 vastase antikehaga 242 (*Eurogenetics*) 5% lõssipulbrilahuses 1 tund toatemperatuuril. Seejärel pesti rakke ja inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril pimedas sekundaarse hiire IgG vastase antikeha-FITC konjugaadiga 5% lõssipulbrilahuses (1/20; *Dako*). Peale pesu analüüsiti valkude ekspressioon FITC helenduse järgi lävivoolutsütomeetris (*BD Immunocytometry systems*).

2.9. Fraktsioneerimine

Rakud koguti trüpsiniseerides 15ml tuubi ja tsentrifuugiti 200 x g 5 minutit 4°C juures. Rakusade suspendeeriti 500µl CLB lahuses (10mM Hepes pH 7,9, 10mM NaCl, 1mM KH₂PO₄, 5mM NaHCO₃, 1mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂), kuhu oli vahetult enne lisatud 5µl 0,5M EDTA (pH 8) ja 20µl 25x proteaaside inhibiitorite segu (*Roche Diagnostics*). Tuubid asetati jääle ja rakud purustati mehhaaniliselt Dounce homogenisaatoriga. Seejärel fuugiti segu 5400 x g 5 minutit 4°C juures. Supernatant tsütoplasmafraktsiooniga tõsteti uude tuubi, kondenseeriti pöörleva vaakumkondensaatoriga RVC 2-25 (*Martin Christ GmbH*) ja kuiv sade lahustati 40µl CLB puhvris.

Tuumafraktsiooni pesti 2x 300µl CLB puhvris ja tsentrifuugiti 3300 x g 30 sekundit. Sade lahustati 500µl TSE puhvris (10mM Tris pH 7,5, 300mM sahharoos,

1mM EDTA (pH 8)), kuhu oli lisatud 0,1% NP40 ja 20µl 25x proteaaside inhibiitorite segu. Peale homogeniseerimist fuugiti rakud 2300 x g 5 minutit 4°C juures. Sade pesti 1x 100µl TSE puhvriga ja fuugiti 9300 x g 1 minut. Tuumade sade lahustati 40µl TSE puhvris ning mõlemas fraktsioonis määrati valgu hulk Bradfordini meetodiga ja analüüsiti *Western blot* meetodil.

2.10. Lutsiferaasi reporteranalüüs

Rakkudelt eemaldati sööde ja tasse pesti 2x külma PBS-ga. Seejärel lisati rakkudele 200µl 1x CCRL lüüsipuhvrit (*Promega*) ja koguti kummispaatliga *Eppendorf*’i tuubidesse. Peale 5 minutit jääl inkubeerimist segati rakke *vortex*-ga 10 sekundit ja tsentrifuugiti maksimumpööretel 30 sekundit. 180µl supernatanti tõsteti uude tuubi, millest 10µl segati kokku 50µl LAR-ga (*Luciferase Assay Reagent; Promega*) ja mõõdeti koheselt valguse eraldumine Tecan Multiscanner’ga (*GENios Plus*). Hiljem määrati lüsaatides Bradfordini meetodiga totaalne valguhulk (Bradford, 1976), mille suhtes võrdsustati lutsiferaasi aktiivsus erinevates proovides.

2.11. Kolooniade formeerumise katse

24 tundi peale PEI transfektsiooni külvati 3x3000 rakku 60-mm Ø tassile või 3x1500 rakku 35-mm Ø tassile (Tabel 5). 24 tunni pärast lisati rakkudele puromütsiini (1µg/ml hiire fibroblastide ja 0,3µg/ml inimese rakuliinide jaoks) sisaldav sööde. Sobiv antibiootikumi kontsentratsioon oli eelnevalt määratud. Rakke kasvatati antibiootikumi juuresolekul 7 päeva. Seejärel pesti rakud 1x PBS-ga ning fikseeriti ~ 20 minuti jooksul loksutil 1ml fikseerimislahuses (0,05% glutaaraldehüüd PBS-s). Seejärel pesti tasse veel 1x PBS-ga ning kolooniad värviti 1ml *Comassie Brilliant Blue R-250*-lahusega (0,1% *Comassie Blue*, 30% etanool, 10% äädikhape, 60% H₂O) üleöö loksutil. Järgmisel päeval eemaldati seondumata värv *Destain*-lahusega (30% etanool, 10% äädikhape, 60% H₂O). Tekkinud kolooniad loeti *Motic* binokulaariga (40x objektiiv). Kolooniade alampiiiriks võeti 15 rakku.

Tabel 5. Kolooniate formeerumise katse ajaline skeem.

1.päev	rakkude transfekteerimine
2.päev	külvamine hõredalt
3.päev	antibiootikumi lisamine
10.päev	rakkude fikseerimine, värvimine
11.päev	kolooniate lugemine

2.12. Rakkude kasvukõvera moodustamine

24 tundi peale transfekteerimist lisati rakkudele puromütsiini sisaldav sööde ning transfekteerunud rakud selekteeriti 21 päeva jooksul. Seejärel külvati 36 000 raku mitmeks ajapunktiks kolmes korduses 60 mm ø tassile transfektsiooni kohta. Rakud loeti Bürkeri kambris tulemuste osas näidatud ajapunktidel ja koostati kasvukõver.

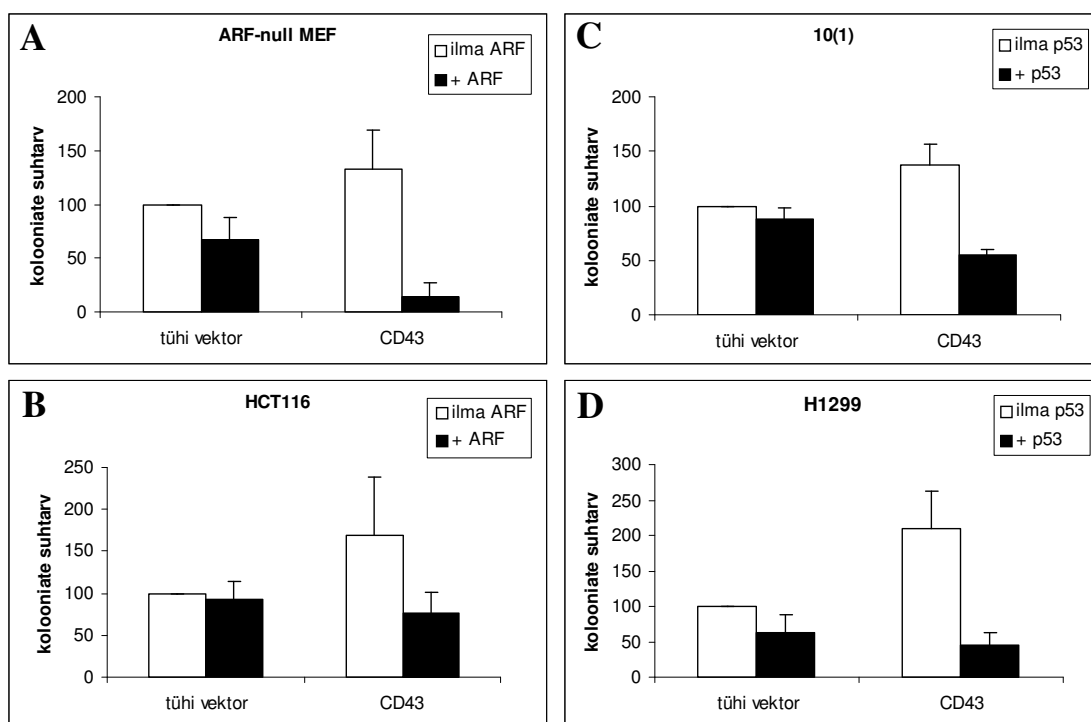
2.13. Apoptoosi määramine

Apoptootiliste rakkude hulga määramiseks koguti rakud 48 tundi peale transfektsiooni 15ml tuubi ja fuugiti 200 x g 5 minutit 4°C juures. Supernatant aspireeriti ja rakud suspendeeriti 100µl sidumispuhvri lahuses (10mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂), kuhu oli lisatud Anneksiin V-PE (*phycoerythrin*; 1:20; *Boehringer mannheim*) ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril pimedas. Seejärel pesti rakke 1ml sidumispuhvriga. Rakusademele lisati 300µl sidumispuhvrit ja analüüsiti läbivoolutsütomeetril (*BD Immunocytometry systems*).

3. Tulemused

3.1. CD43 üleekspressioon soodustab kolooniate moodustumist rakkudes, kus puudub kas ARF või p53

On näidatud, et tuumorsupressor p53 akumuleerub erinevate kasvajate, sealhulgas ka käärsöole kasvaja algfaasis (Levi *et al.*, 1996; Mazars *et al.*, 1991). Meie töögrupp on varem leidnud, et CD43 indutseerib ARF kaudu funktsionaalselt aktiivse p53 akumuleerumise (Kadaja *et al.*, 2004). Eesmärgiga uurida lähemalt CD43 potentsiaalset rolli kasvaja tekkel, vaatasin CD43 üleekspressiooni mõju kolooniate moodustumisele erineva ARF ja p53 staatusega hiire ja inimese rakuliinides (Tabel 3. Materjal ja meetodika osas). ARF-null MEF ja HCT116 rakuliinid ekspresseerivad p53 aga mitte ARF, 10(1) ja H1299 rakud ekspresseerivad ARF, aga mitte p53. Rakke



Joonis 6. CD43 üleekspressioon suurendab kolooniate arvu juhul kui rakkudes puudub kas ARF või p53, ent inhibeerib kolooniate moodustumist ARF ja p53 olemasolul. ARF-negatiivseid MEF (A), HCT116 (B) ja p53-negatiivseid 10(1) (C), H1299 (D) rakke transfecteeriti tühja või CD43 ekspressiooniplasmidiga eraldi ning koos ARF või p53-ga, külvati hõredalt ning selekteeriti puromütsiini juuresolekul kolooniate moodustumiseni. Tekkinud kolooniad värviti ja loeti mikroskoobis. Saadud tulemused on esitatud tühja vektoriga transfecteeritud rakkude kolooniate arvu suhtes ning vea piirid on saadud kolme katse põhjal.

transfekteeriti tühja ja CD43 ekspresseeriva vektoriga üksi ning koos ARF või p53-ga. 24h hiljem külvati rakud hõredalt ning lasti kasvada kolooniate moodustumiseni. CD43 üleekspressioon soodustas kolooniate teket kõikides uuritud rakuliinides, kus puudus kas ARF või p53 (Joonis 6, A-D). Samas rakkudes, kus oli olemas nii ARF kui ka p53, oli CD43 üleekspressioonil kolooniate moodustumine inhibeeritud. Need tulemused näitavad, et rakkude kasvu inhabeerimiseks CD43 üleekspressiooni korral on vajalikud nii ARF kui ka p53.

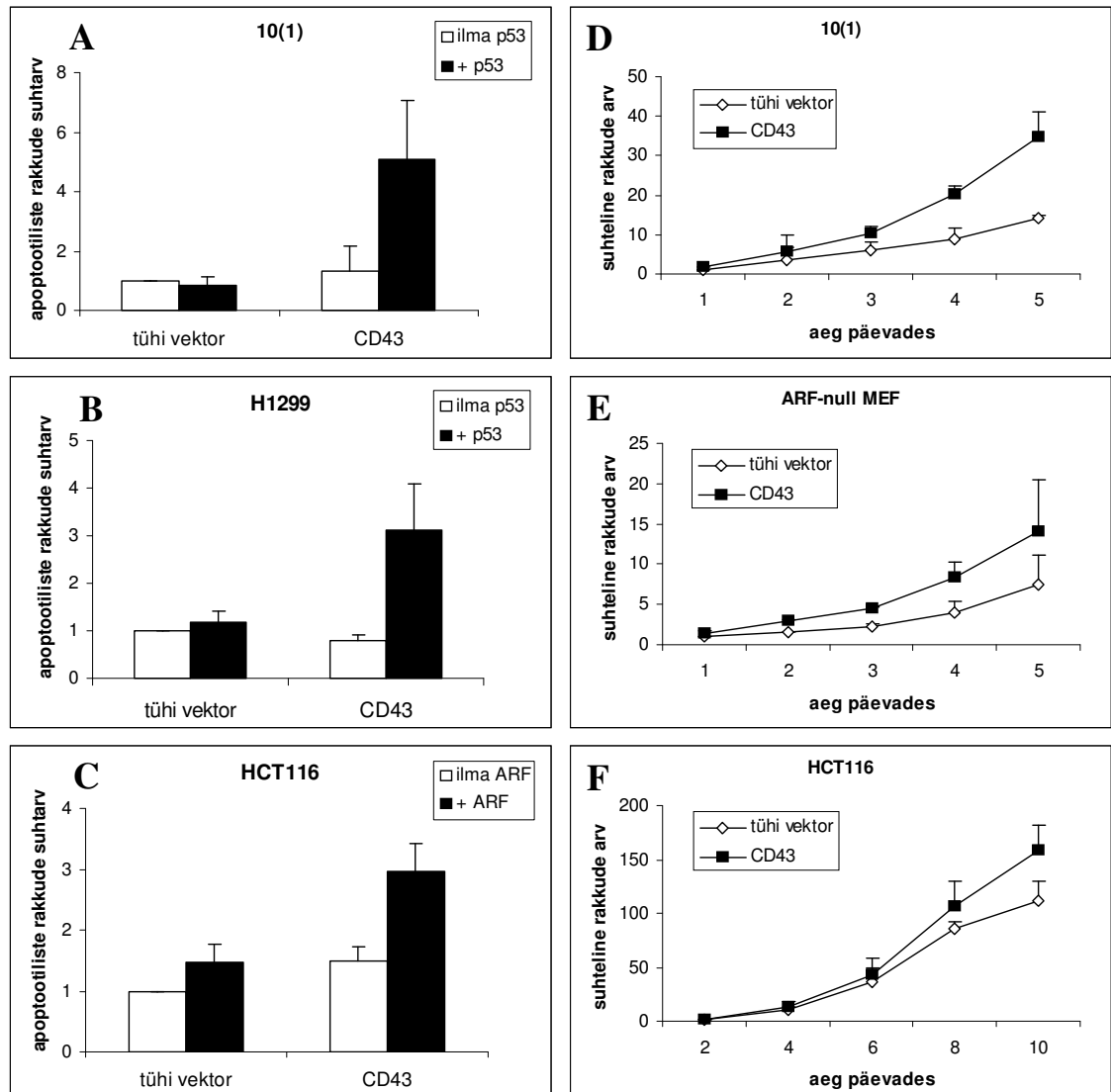
3.2. CD43 üleekspressioon indutseerib ARF/p53-sõltuva apoptoosiraja

On teada, et vastusena onkogeenide aktivatsioonile indutseerib p53 ARF-sõltuvalt rakkude apoptoosi, mis on oluline kasvaja tekke takistamise mehhanism (Lowe & Sherr, 2003). Seega võiks ARF/p53 sõltuv vähenenud kolooniate arv CD43 üleekspressiooni korral olla tingitud apoptoosi indutseerimisest nendes rakkudes. Selle kindlaks tegemiseks transfekteerisime rakke sarnaselt eelnevaga, märgistasime Anneksiin V-ga ning analüüsisime läbivoolutsütomeetris 48h pärast transfektsiooni. Apoptootiliste rakkude hulk kasvas oluliselt CD43 üleekspressioonil koos p53-ga p53-negatiivsetes rakkudes 10(1) ja H1299 (Joonis 7, A ja B) ning koos ARF-ga ARF-negatiivsetes rakuliinides HCT116 (Joonis 7C) ja ARF-null MEF (Kadaja *et al.*, 2004). Seega aktiveerub CD43 üleekspressiooni korral ARF/p53 signaalirada, mis viib rakud apoptoosi.

3.3. CD43 üleekspressioon soodustab rakkude jagunemist ARF või p53 ekspressiooni puudumise korral

CD43 üleekspressioon suurendas kontrolliga võrreldes kolooniate arvu, juhul kui rakkudes puudus kas ARF või p53 (Joonis 6), mis võiks viidata CD43 rollile mitogeense stiimulina või rakkude elulemuse mõjutajana, mis põhjustab p53-raja aktiveerumise. CD43 mõju lähemaks uurimiseks rakkude jagunemisele võrdlesime ARF- või p53-negatiivsete rakkude kasvukõveraid CD43 madala endogeense ja üleekspressiooni korral. Rakke transfekteeriti tühja või CD43 ekspressiooniplasmiidiga ning külvati tassidele mitmes korduses. Rakud loeti järgnevatel päevadel ning saadud rakkude arv kanti graafikule. Ootuspäraselt stimuleeris CD43 üleekspressioon rakkude proliferatsiooni ARF-defektsetes MEF-s ja HCT116 rakkudes (Joonis 7, E ja F), samuti

p53-defektsetes 10(1) (Joonis 7D) ja H1299 rakkudes (L. Kadaja-Saarepuu avaldamata andmed). Need tulemused kinnitavad, et CD43 võib omada kasvu soodustavat mõju ning funktsioneerida onkogeenses rajas.



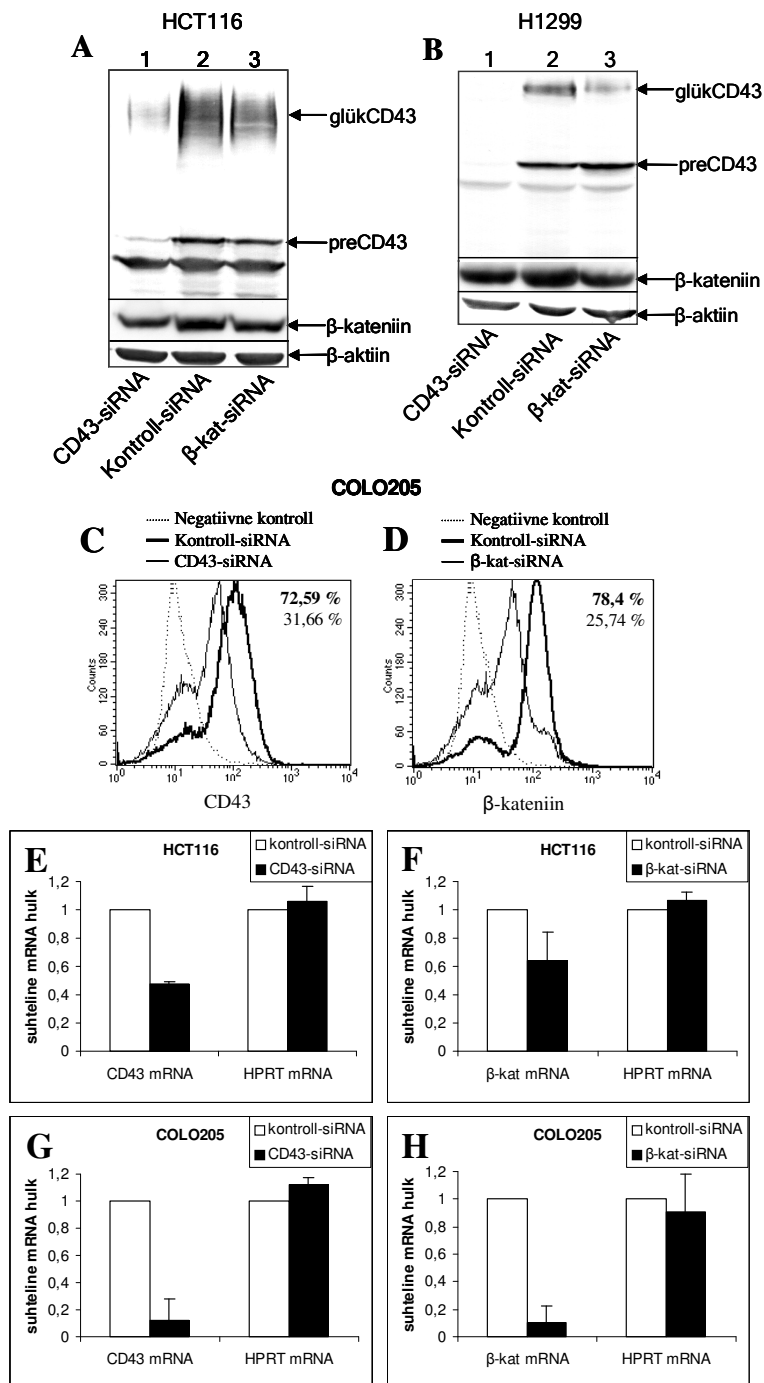
Joonis 7. A-C: CD43 üleekspressioon suurendab apoptootiliste rakkude arvu ARF ja p53 olemasolul, aga mitte kui ARF või p53 puuduvad. p53-negatiivseid 10(1) (A), H1299 (B) ja ARF-negatiivseid HCT116 (C) rakke transfecteeriti nagu on kirjeldatud Joonis 6 allkirjas, märgistati Anneksiin-V-ga 48h peale transfectsiooni ning analüüsiti läbivoolutsütomeetris. Kolme katse keskmine tulemus on esitatud tühja vektori kui kontrolli suhtes. **D-F:** CD43 üleekspressioon soodustab rakkude jagunemist. 10(1) (D), ARF-null MEF (E) ja HCT116 (F) rakke transfecteeriti tühja ja CD43 ekspresseeriva plasmiidiga, kasvatati selekteerivas söötmes ning külvati 36 000 raku 60 mm ø tassile. Rakkude arv loeti Bürkeri kambris joonisel näidatud ajapunktidel. Tulemused on esitatud algselt tassile külvatud rakkude arvu suhtes ja on saadud kolme katse põhjal.

3.4. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamine siRNA-ga inimese rakuliinides

Lisaks üleekspressiooni tingimustes saadud tulemustele oleks oluline kontrollida CD43 soodustavat mõju rakkude kolooniate formeerumisele teises katsesüsteemis, vaadates, kuidas CD43 ekspressiooni vähendamine kolooniate teket mõjutab. Selleks kasutasin RNA interferentsi tehnoloogiat (RNAi).

RNAi on populaarne ja efektiivne meetod spetsiifiliste geenide ekspressiooni vaigistamiseks imetajarakkudes (Elbashir *et al.*, 2001). See toimub kaheaheelalise RNA kaudu, mis indutseerib rakkudes komplementaarsuse alusel sihtmärk mRNA lagundamist. Positiivseks kontrolliks võtsin β -kateniini, mille roll onkogeenina on hästi kirjeldatud (Polakis, 2000; Radtke & Clevers, 2005). Rakke transfekteeiti esmalt vastavate siRNA-ga või mitte-spetsiifilise kontrolli siRNA-ga ning 24h hiljem CD43 ekspresseeriva vektoriga. Veel 24h hiljem rakud lüüsi ja teostati *Western blot* analüüs. RNAi töötas efektiivselt CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamisel H1299 ja HCT116 rakkudes (Joonis 8A ja B, rajad 1 ja 3), kuigi endogeense β -kateniini puhul oli efekt mõnevõrra väiksem. Edaspidi vaatasin RNAi efekti β -kateniini ekspressioonile rakulüsaadi tsütoplasma- ja tuumafraktsioonis eraldi ning selgus, et siRNA-d mõjutavad eelkõige tuuma β -kateniini valgu taset (vt Tulemused 3.8). Seega ei pruugi totaalse β -kateniini ekspressiooni vähenemine RNAi korral stabiilsema membraanse β -kateniini ekspressiooni tõttu nii hästi esile tulla.

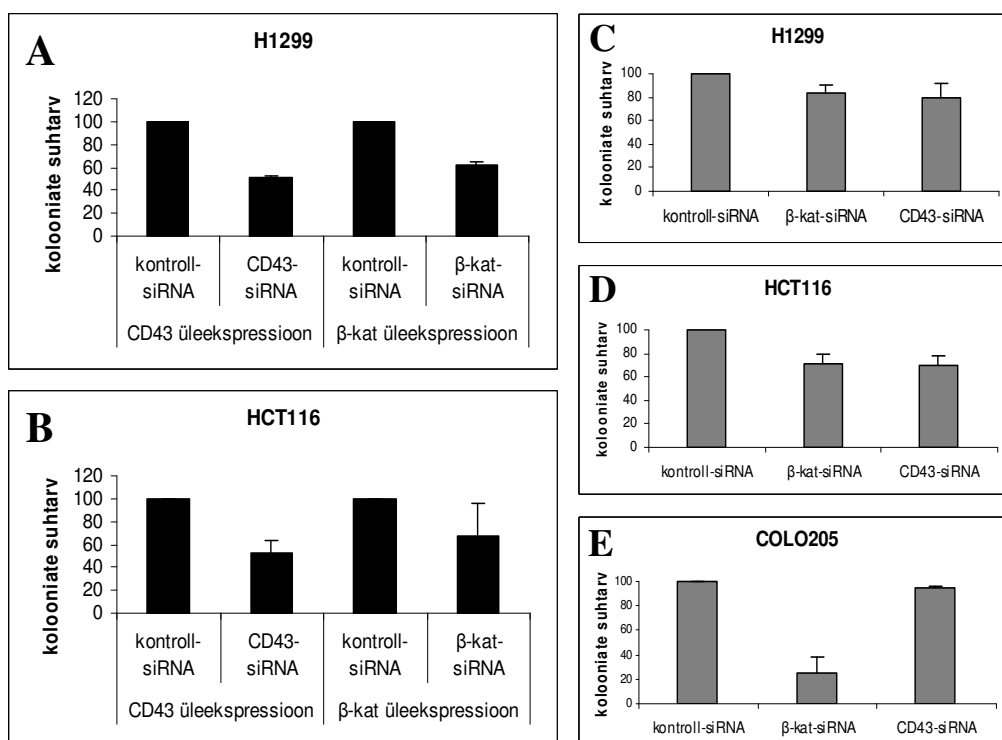
siRNA mõju endogeensele CD43-le vaatasin COLO205 rakuliinis, mis ekspresseerib CD43 kõrgel tasemel (Baeckstrom *et al.*, 1995). Selleks analüüsiiti CD43 ja β -kateniini ekspressiooni 48h peale siRNA transfektsiooni läbivoolutsütomeetris. siRNA töötlus vähendas COLO205 rakuliinis endogeense CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vastavalt kaks kuni kolm korda (Joonis 8C ja D). siRNA efekt avaldus ka CD43 ja β -kateniini mRNA tasemel HCT116 (Joonis 8E ja F) ja COLO205 rakkudes (Joonis 8G ja H), kus RNA eraldati 48h peale transfektsiooni ning mRNA hulk määrati Q-RT-PCR-ga. Mitte-relevantse kontrolli HPRT mRNA taset CD43 ja β -kateniini siRNA ei mõjutanud (Joonis 8E-H). Seega meie süsteemis RNAi töötab ja on kasutatav edasistes funktsionaalsetes katsetes.



Joonis 8. CD43 ja β-kateniini ekspressiooni vaigistamine siRNA-ga inimese rakuliinides. HCT116 (A) ja H1299 (B) rakke transfekeeriti 3μg vastavate spetsiifiliste ja kontroll-siRNA-ga ning 24h hiljem CD43 ekspresseeriva vektoriga. CD43 ja β-kateniini valgu ekspressioon analüüsiti 48h pärast siRNA transfektsiooni *Western blot* meetodil. siRNA mõju endogeense CD43 (C) ja β-kateniini (D) ekspressioonile vaadati COLO205 rakuliinis läbivoolutsütomeetris 48h pärast 3μg siRNA transfektsiooni. Näidatud % kirjeldab vastava valgu ekspressiooni suhtes positiivsete rakkude osa kogu populatsioonist. Negatiivse kontrollina inkubeeriti rakke hiire p53 vastase ak-ga 242, mille suhtes (väärtus ~1%) on tulemused esitatud. siRNA mõju CD43 ja β-kateniini mRNA tasemele vaadati HCT116 (E ja F) ja COLO205 (G ja H) rakkudes. Mitte-relevantse kontrollina vaadati HPRT mRNA-d. Totaalne RNA eraldati 48h pärast 3μg siRNA transfektsiooni 60-mm Ø tassilt proovi kohta, millest 1/10 analüüsiti Q-RT-PCR meetodil. Tulemused on esitatud kolme katse keskmisena.

3.5. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamine vähendab kasvajakarakuliinide kolooniate moodustumist

β -kateniini raja konstitutiivne aktivatsioon mängib keskset rolli käärsoolekasvaja arengus. Mutatsioonid selles rajas põhjustavad β -kateniini stabiliseerimise ja tuuma liikumise, kus ta koos Tcf/Lef faktoritega aktiveerib rakkude proliferatsiooni stimuleerivate geenide ekspressiooni (Moon *et al.*, 2004). Kuna on näidatud, et β -kateniini ekspressiooni inhibeerimine vähendab käärsoolekasvajakude kasvu (Verma *et al.*, 2003), vaatasin CD43 inhibeerimise mõju kolooniate tekkele kõrvuti β -kateniini kui positiivse kontrolliga. Rakke transfecteeriti vastavate siRNA-ga ning 24h hiljem CD43 ja β -kateniini ekspresseerivate vektoritega. Katse edasine käik oli sama eelpoolkirjeldatuga (Tulemused 3.1). Nii β -kateniini kui ka CD43 ekspressiooni vaigistamise korral oli H1299 ja HCT116 rakkude kolooniate teke inhibeeritud, võrreldes kontrollrakkudega (Joonis 9A ja B).



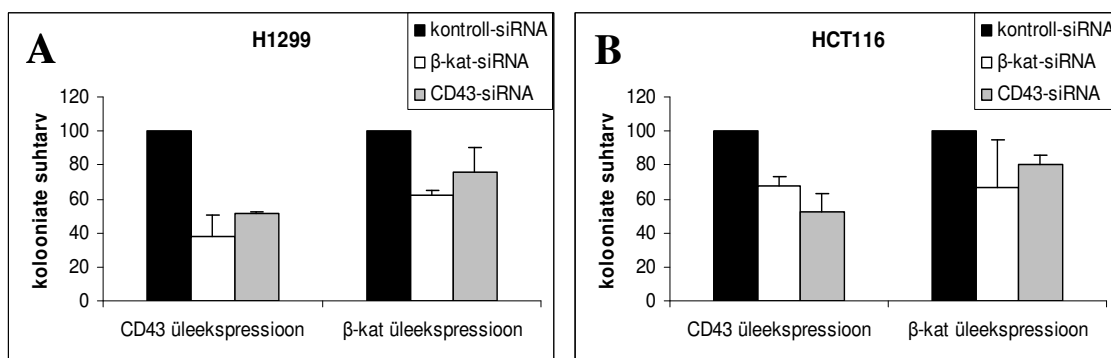
Joonis 9. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamine inhibeerib kasvajakarakuliinide kolooniate moodustumist. **A, B:** H1299 ja HCT116 rakke transfecteeriti vastavate siRNA-ga ning seejärel CD43 ja β -kateniini ekspresseeriva plasmiidiga. Kolooniate katse teostati nagu on kirjeldatud Joonis 6 allkirjas. Tulemused on esitatud kontroll-siRNA-ga transfecteeritud rakkude kolooniate arvu suhtes ning esindavad kolme katse keskmist. **C-E:** H1299, HCT116 ja COLO205 rakke transfecteeriti vastavate siRNA-ga, et vaadata endogeense CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamise mõju kolooniate formeerumisele. Tulemused on esitatud sarnaselt jooniste A ja B-ga kontroll-siRNA suhtes ja on saadud kahe katse põhjal.

Saadud tulemuste kinnitamiseks vaatasin endogeense CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamise mõju kolooniate moodustumisele H1299, HCT116 ja COLO205 rakuliinis, millest viimane ekspresseerib CD43 teiste rakkudega võrreldes kõrgemal tasemel. Saadud tulemused H1299 ja HCT116 rakkudes (Joonis 9C ja D) olid vastavuses eelnevaga ja näitavad, et nii CD43 kui β -kateniini inhibeerimine takistab kasvajarakkude kolooniate moodustumist. β -kateniini siRNA inhibeeris drastiliselt kolooniate teket COLO205 rakkudes (Joonis 9E) ent mitte CD43 siRNA. See võiks olla tingitud kolooniate formeerumise meetodi eripärast, kus rakud külvatakse alguses tassile hõredalt. Nimelt ekspresseerivad hõredalt kasvavad COLO205 rakud endogeenset CD43 poole madalamal tasemel kui tihedalt kasvavad rakud (A. Balikova avaldamata andmed). H1299 ja HCT116 rakkudes on see vastupidi. See oleks üheks võimalikuks seletuseks, miks endogeense CD43 ekspressiooni vaigistamine ei avaldanud märkimisväärset mõju COLO205 kolooniate tekkele.

3.6. CD43 ja β -kateniini koosmõju kolooniate formeerumisele

Lisaks β -kateniini rollile kasvajate tekkel on teada, et CD43 tsütoplasmaatiline osa seondub β -kateniiniga ning soodustab selle sihtmärkgeenide (*c-Myc* ja *tsükliin D*) ekspressiooni (Andersson *et al.*, 2004). Seetõttu tekkis huvi vaadata, kas nähtud β -kateniini ja CD43 mõju rakkude kasvule võiks olla omavahel seotud. Selleks vaatasin CD43 ja β -kateniini üleekspressiooni mõju rakkude kolooniate formeerumise võimele tingimustes, kus vastavalt kas β -kateniini või CD43 ekspressioon oli vaigistatud. Rakke töödeldi nagu on kirjeldatud eelmises punktis ning määrati tekkinud kolooniate arv. Kuna β -kateniini vaigistamine vähendas CD43 üleekspressiooni mõju rakkude kasvule (Joonis 10A ja B, tulp 2), viitab see võimalikule β -kateniini signaaliraja osalusele CD43 poolt indutseeritud rakkude jagunemisel. Lisaks on märkimisväärne, et CD43 ekspressiooni vaigistamine takistas β -kateniini rakkude kasvu stimuleeriva mõju avaldumist (Joonis 10A ja B, tulp 6). See tulemus vihjab omakorda sellele, et CD43 võiks vahendada β -kateniini rajast lähtuvaid kasvusignaale. CD43 ja β -kateniini omavahelise mõju olemasolu valgu tasemel toetab ka RNAi kontrollkatse tulemus, kus oli näha, et CD43 ja β -kateniini siRNA mõjutasid vastastikku teineteise ekspressiooni HCT116, H1299 (Joonis 8A ja B, rajad 1 ja 3) ja COLO205 rakkudes (esitamata andmed). Seega funktsioneerivad CD43 ja β -kateniin rakkude jagunemise

soodustamisel vähemalt osaliselt kattuvast rajas. See kinnitab CD43 potentsiaalset rolli ja seost Wnt-rajaga kasvaja tekkel.

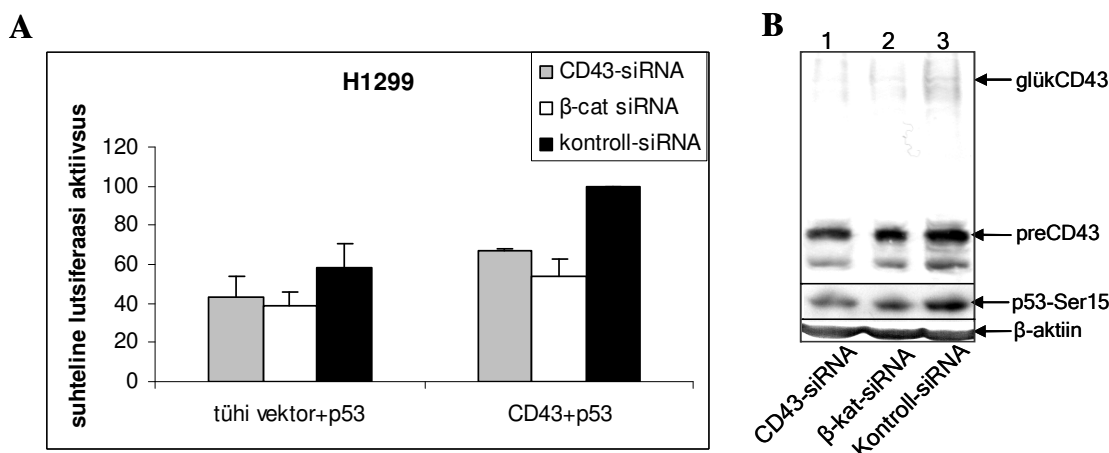


Joonis 10. CD43 ja β-kateniini koosmõju kolooniate formeerumise võimele. H1299 (A) ja HCT116 (B) rakke transfekeeriti vastavate siRNA-ga ning seejärel CD43 ja β-kateniini ekspresseeriva plasmiidiga. Kolooniate katse teostati nagu on kirjeldatud Joonis 6 allkirjas. Tulemused on esitatud kontroll-siRNA-ga transfekeeritud rakkude kolooniate arvu suhtes ning on saadud kolme katse põhjal.

3.7. p53 aktiveerimiseks CD43 poolt on vajalik β-kateniini olemasolu

Oleme varem näidanud, et CD43 üleekspressioon indutseerib aktiivse p53 valgumakumuleerumise sõltuvalt ARF olemasolust (Kadaja *et al.*, 2004). Käesoleva töö tulemused viitavad sellele, et p53 aktivatsioon on tingitud CD43 stimuleerivast mõjust rakkude jagunemisele. Kuna β-kateniini ekspressiooni vaigistamine vähendas CD43 mõju proliferatsioonile (Joonis 10A ja B, tulp 2), tekkis huvi vaadata, kas β-kateniin on oluline p53-rajaga aktiveerimisel CD43 poolt. Selleks vaatasin CD43 mõju p53-sõltuva tsükliin G promootori aktivatsioonile ilma ja koos β-kateniini siRNA-ga. Rakke transfekeeriti esmalt vastavate siRNA-ga, millele järgnes erinevate ekspressiooniplasmiidide ja reporterplasmidi kotransfektsioon. Lutsiferaasi aktiivsus määrati 48h peale siRNA transfektsiooni. β-kateniini ekspressiooni inhibeerimine vähendas p53 aktiveerumise vastusena CD43 üleekspressioonile (Joonis 11A, tulp 5), samuti vähenes p53 basaalne aktiivsus (Joonis 11A, tulp 2). Samades rakkudes analüüsisin ka p53 valgumakumuleeritust antikehaga Ser15. Ser15 fosforüleerumine viitab p53 stabiliseerumisele ja aktiveerumisele, sest takistab MDM2-vahendatud p53 degradeerimist (Giaccia & Kastan, 1998). Ka CD43 üleekspressiooni korral suureneb p53 fosforüleeritus Ser15 positsioonis (Kadaja *et al.*, 2004). Nagu on näha joonisel 11B, p53 valgumakumuleerimine väheneb kui inhibeerida CD43 ekspressioon (rajad 1 ja 3).

Sama fenomen avaldub kui β -kateniini ekspressioon on inhibeeritud (Joonis 11B, rada 2). Saadud tulemused näitavad, et p53 aktiveerimiseks CD43 poolt on vajalik β -kateniini olemasolu.

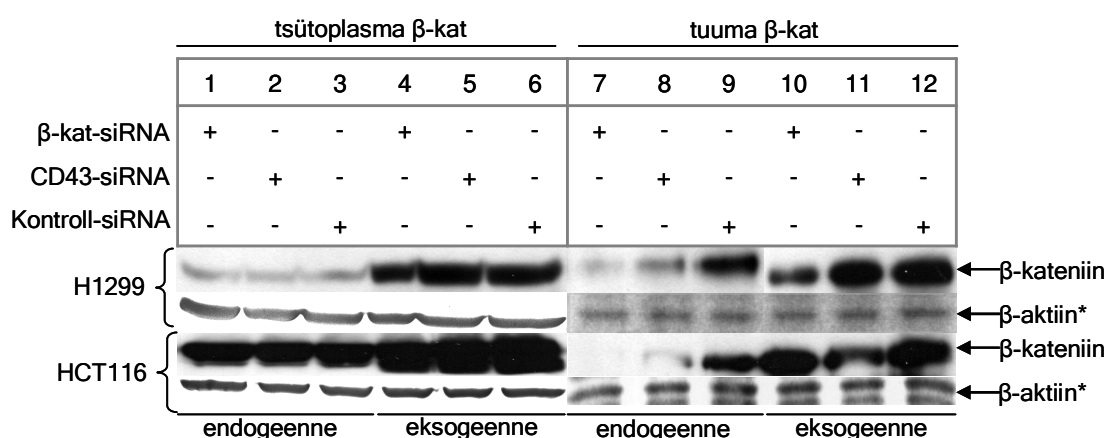


Joonis 11. β -kateniini olemasolu on vajalik p53 aktiveerimiseks CD43 poolt. **A:** H1299 rakke transfekeeriti vastavate siRNA-ga ja 24h hiljem 3 μ g tühja ja CD43 ekspressiooniplasmiidiga koos 1 μ g p53 ja CyclG-prom reporterplasmiidiga. Lutsiferaasi aktiivsus määrati 48h pärast siRNA transfektsiooni ja tulemused normaliseeriti Bradford testiga. Tulemused on esitatud kontroll-siRNA ja CD43-ga transfekeeritud rakkude lutsiferaasi aktiivsuse suhtes (väärtuseks võeti 100) ning on saadud kolme katse põhjal. **B:** Samades rakkudes (A) analüüsiti p53 valgu ekspressioon Ser-15 fosforüleerimistundliku ak-ga *Western blot* meetodil.

3.8. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni vaigistamine mõjutab β -kateniini valgu hulka tuumas

Enamikes käärsöolekasvajates lokaliseerub β -kateniin tuumas, kus ta reguleerib kasvaja arenguks oluliste geenide ekspressiooni (Kikuchi, 2000). Teades, et CD43ct seostub β -kateniiniga ja mõjutab selle sihtmärkgeenide ekspressiooni (Andersson *et al.*, 2004), tekkis huvi uurida, kuidas mõjutab CD43 ekspressiooni vaigistamine β -kateniini hulka tuumas. Lisaks oli eesmärk vaadata, kas nähtud β -kateniini siRNA efekt (Joonis 8A ja B) avaldub eelkõige tuuma β -kateniinile, mis osaleb meid huvitavates bioloogilistes funktsioonides. Selleks transfekeeriti H1299 ja HCT116 rakke siRNA-de ja tühja või β -kateniini ekspressiooniplasmiidiga ning valmistati eraldi tsütoplasma- ja tuumafraktsioon, mida analüüsiti *Western blot* meetodil. Endogeense ja eksogeense β -kateniini hulk tsütoplasmas püsis muutumatuna kõikides proovides, olenemata siRNA töötlustest (Joonis 12, rajad 1-3 ja 4-6). β -kateniini siRNA-d inhibeerisid täielikult tuumas lokaliseeruva valgu ekspressiooni (Joonis 12, rada 7), kuigi eksogeense β -kateniini korral H1299 rakkudes oli efekt pisut väiksem või puudus üldse HCT116

rakkudes (Joonis 12, rada 10). Võimalik, et kasutatud siRNA kogus (3µg) polnud piisavalt suur, et üleekspressiooni tingimustes β-kateniini täielikult inhibeerida. Oluline oli näha, et CD43 siRNA-d blokeerisid β-kateniini ekspressiooni tuumas (Joonis 12, rada 8), mis viitab CD43 rollile β-kateniini tuumalokalisatsiooni reguleerimises. See tulemus on vastavuses varasemate andmetega (Andersson *et al.*, 2004) ning kinnitab hüpoteesi, et CD43 osalus käärsoolekasvaja arengu algfaasis võiks olla seotud Wnt-rajaga.

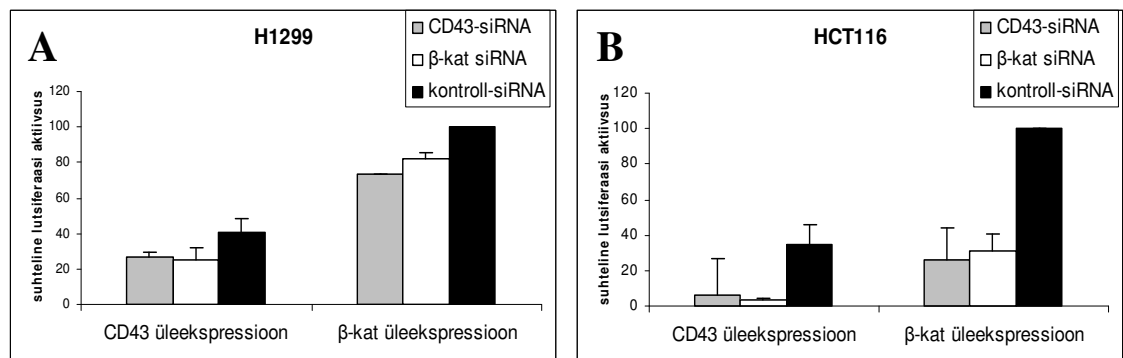


Joonis 12. Tuumas β-kateniini hulk väheneb CD43 ja β-kateniini ekspressiooni vaigistamise korral. H1299 ja HCT116 rakke transfecteeriti 3µg vastavate siRNA-ga ning tühja (rajad 1-3 ja 7-9) või β-kateniini ekspresseeriva plasmiidiga (rajad 4-6 ja 10-12). 48h pärast siRNA transfectiooni rakud lüüsi ja eraldati tsütoplasma- ja tuumafraktsioon. Endo- ja eksogeense β-kateniini ekspressioon analüüsiti *Western Blot* meetodil. * - tuumalüsaadis ei õnnestunud β-aktiini detekteerida (rajad 7-12), mistõttu võeti võrdse valgu hulga kontrolliks *Comassie Brilliant Blue R-250*-lahusega värvitud geelipilt.

3.9. Tcf/Lef-sõltuva transkriptsiooni aktiveerimiseks on vajalik nii β-kateniini kui ka CD43 olemasolu

Lisaks tuumas lokaliseerumisele on β-kateniini funktsioneerimiseks oluline koos Tcf/Lef transkriptsioonifaktoritega transkriptsiooni aktiveerida. CD43 mõju β-kateniini transkriptsioonilisele aktiivsusele vaatasime TopFlash ja FopFlash reporterkonstruktsioonide abil, millest esimene sisaldab kolmes korduses optimaalset ja teine mutantset Tcf/Lef-sõltuvat promootorjärjestust koos lutsiferaasi kodeeriva geeniga (Korinek *et al.*, 1997). CD43 üleekspressioon tõstis nii β-kateniini basaalselt kui ka üleekspressiooni kaudu võimendatud transkriptsioonilist aktiivsust H1299 ja HCT116 rakkudes (L. Kadaja-Saarepuu avaldamata andmed). CD43 mõju täpsemaks hindamiseks β-kateniini aktiivsusele transfecteerisin rakke vastavate siRNA-ga ning seejärel CD43 ja β-kateniini

ekspresseeriva plasmidi ja reporterplasmidiga. Lutsiferaasi aktiivsus määrati 48h peale siRNA transfektsiooni. CD43 ja β -kateniini ekspressiooni inhibeerimine H1299 ja HCT116 rakkudes (Joonis 13A ja B) vähendasid võrdselt Tcf/Lef-sõltuva promootori aktiveerimist nii β -kateniini basaalsel tasemel (tulbad 1-3) kui ka üleekspressiooni korral (tulbad 4-6). Negatiivse kontrolli FopFlash aktiivsus nendes rakkudes oli madal (esitamata andmed). Need tulemused näitavad, et β -kateniin-sõltuva promootori maksimaalseks aktiivsuseks on vajalik nii CD43 kui ka β -kateniini olemasolu.



Joonis 13. Tcf/Lef-sõltuva promootori aktiveerimiseks on vajalik nii β -kateniini kui CD43 olemasolu. H1299 (A) ja HCT116 (B) rakke transfekteeriti vastavate siRNA-ga ning seejärel 3 μ g CD43 või β -kateniini ekspresseeriva plasmidiga koos 1 μ g TopFlash reporterplasmidiga. Lutsiferaasi aktiivsus määrati 48h pärast siRNA transfektsiooni ja normaliseeriti negatiivse kontrolli FopFlash aktiivsuse järgi. Tulemused on esitatud kontroll-siRNA ja β -kateniiniga transfekteeritud rakkude lutsiferaasi aktiivsuse suhtes (väärtuseks võeti 100) ja on saadud kolme katse põhjal.

4. Arutelu

Kasvajarakke iseloomustab nende suurenenud kasvukiirus, mis võib olla põhjustatud samaaegselt nii onkogeenide aktivatsioonist kui ka tuumorsupressorite inaktivatsioonist. Selline olukord esineb ka käärsoolekasvaja arengus, kus esmaseks sündmuseks on mutatsioonide teke tuumorsupressor *APC* geenis või onkogeenis β -kateniin, mille tulemusena β -kateniin kuhjub rakku ning aktiveeritakse kasvaja tekkeks oluliste geenide transkriptsioon (Behrens & Lustig, 2004; Segditsas & Tomlinson, 2006). Mutatsioonid *p53* geenis avalduvad kasvaja arengu hilisemas faasis (Mazars *et al.*, 1991). Lisaks onkogeenide aktivatsioonile leiavad kasvajarakkudes aset mitmed lisamuutused, mis on põhjustatud normaalse rakkudega võrreldes kõrgemal või madalamal tasemel ekspresseeritud valkude poolt.

Kuna CD43 ekspresseeritakse ebanormaalsel tasemel mitmetes kasvajakudedes, sealhulgas käärsoolekasvaja algfaasis (adenoomides) aga mitte normaalses koolonis, viitab see tema potentsiaalsele rollile kasvaja tekkel (Pimenidou *et al.*, 2004; Sikut *et al.*, 1997). Vastusena onkogeensele stressile aktiveeritakse rakus tuumorsupressor *p53*, mida vahendab tuumorsupressor ARF (Sherr & Weber, 2000). ARF inhibeerib *p53* negatiivset regulaatorit MDM2, mille tulemusena *p53* stabiliseerub ja käivitatakse rakkude kasvu pidurdavad signaalirajad (Sherr, 2006). Kuna vastusena CD43 üleekspressioonile aktiveerub ARF/*p53* rada (Kadaja *et al.*, 2004), toetab see hüpoteesi, mille kohaselt võiks CD43 käituda mitogeense stiimulina ja kutsuda rakus esile kaitsemehhanismid hüperproliferatsiooni vastu. Käesolevas töös otsiti sellele hüpoteesile kinnitust ning uuriti lähemalt *p53*-raja aktiveerumise bioloogilist tähtsust vastusena CD43 üleekspressioonile, vaadates CD43 mõju rakkude jagunemisele. Ühtlasi uuriti CD43 seost β -kateniini rajaga rakkude kasvu soodustamisel, sest on teada, et CD43 ja β -kateniin interakteeruvad omavahel, mille tulemusena aktiveeritakse β -kateniini sihtmärkgeenide ekspressioon (Andersson *et al.*, 2004).

Rakkude kasvu uurimiseks kasutasin kolooniate formeerumise katset, mille tulemused näitavad, et CD43 üleekspressioon soodustab kolooniate teket rakkudes, kus puudub kas ARF või *p53* (Joonis 6). CD43 stimuleerivat mõju rakkude jagunemisele kinnitab rakkude kasvukõverate võrdlus, kus on näha, et CD43 üleekspressiooni korral kasvavad rakud kontrollrakkudega võrreldes kiiremini (Joonis 7D-F). CD43 ekspressiooni inhibeerimine siRNA-ga aga vähendab rakkude võimet kolooniaid

moodustada, mis kinnitab, et nähtud efekt rakkude jagunemisele on CD43-spetsiifiline (Joonis 9A ja B). Lisaks üleekspressiooni tingimustele inhibeerib endogeense CD43 ekspressiooni vaigistamine kolooniate moodustumist nii H1299 kui ka HCT116 rakuliinides (Joonis 9C ja D). Need tulemused näitavad, et CD43 ekspressioon annab kasvajarakkudele jagunemiseelise võrreldes rakkudega, kus CD43 ei ekspresseerita.

COLO205 rakkudes, mis ekspresseerivad CD43 kõrgel tasemel (Baeckstrom *et al.*, 1995) ning milles CD43 ekspressiooni inhibeerimine võiks oodatavalt vähendada kolooniate teket veelgi enam, ei sõltunud kolooniate formeerumise võime CD43 olemasolust (Joonis 9E). Uurides CD43 ekspressiooni COLO205 rakkudes sõltuvalt rakkude tihedusest, leidis meie uurimisgrupi liige A. Balikova, et erinevalt H1299 ja HCT116 rakkudest ekspresseerivad hõredalt kasvavad COLO205 rakud CD43 tunduvalt madalamal tasemel kui tihedalt kasvavad rakud. Kuna kolooniate formeerumise katse aluseks on rakkude võime hõredalt külvatuna kolooniaid moodustada, siis on võimalik, et sellistes tingimustes on CD43 ekspressioon COLO205 rakkudes liiga madal, et rakkude kasvule mõju avaldada. Selle kindlaks tegemiseks võiks ühe võimalusena vaadata, kas CD43 üleekspressioon COLO205 rakkudes mõjutab kolooniate teket.

Vastupidiselt CD43 mõjule rakkude kasvule tingimustes, kus rakkudes puudub kas ARF või p53, on CD43 üleekspressioonil ARF ja p53 olemasolul kolooniate teke inhibeeritud (Joonis 6). See näitab, et vastusena CD43 üleekspressioonile aktiveerub rakkudes ARF/p53 rada ning rakkude kasv pidurdatakse. p53 üheks tähtsamaks funktsiooniks tuumorsupressorina on võime apoptoosi indutseerida ja seeläbi takistada ebanormaalselt jagunevate rakkude levimine (Lowe & Sherr, 2003). Kuna CD43 üleekspressioon põhjustab rakkude apoptoosi mineku sõltuvalt ARF ja p53 olemasolust (Joonis 7A-C), selgitab see nende rakkude vähenenud kolooniate arvu. Seega stimuleerib CD43 rakkude proliferatsiooni, mille tulemusena aktiveerub ARF/p53 rada, mis viib rakud apoptoosi. Need tulemused näitavad, et CD43 võiks käituda rakkude kasvu soodustava stiimulina ja seeläbi mängida rolli kasvaja tekke algfaasis.

β -kateniini roll onkogeeninena on hästi kirjeldatud (Polakis, 2000). Kasvajarakkudes on häiritud tema degradatsioon, mille tulemusena koguneb β -kateniin tsütoplasmasse ja liigub tuuma, et geeniekspressiooni reguleerida. On teada, et β -kateniin stimuleerib rakkude kasvu ja põhjustab ARF/p53 raja aktiveerumise (Damalas *et al.*, 2001). Seetõttu valisin β -kateniini positiivseks kontrolliks CD43 ekspressiooni vaigistamise mõju uurimisel kolooniate moodustumisele. Nii β -kateniini kui ka CD43

inhibeerimine siRNA-ga vähendasid võrdselt kolooniate formeerumise võimet (Joonis 9A ja B), mis kinnitab, et rakkude jagunemiseks on vajalik mõlema valgu olemasolu.

On teada, et CD43ct seostub β -kateniiniga ning võimendab selle sihtmärkgeenide *c-Myc* ja *tsükliin D* ekspressiooni (Andersson *et al.*, 2004). Vaadates CD43 ja β -kateniini võimalikku koosmõju kolooniate tekke soodustamisel, selgub, et kummagi valgu mõju kolooniate formeerumise võimele väheneb kui vastavalt CD43 üleekspressioonil β -kateniini või β -kateniini üleekspressioonil CD43 ekspressiooni inhibeerida (Joonis 10A ja B). Üheltpoolt on see oluliseks näitajaks, et CD43 osalus käärsoole kasvaja arengus võiks olla seotud Wnt-rajaga. Seda kinnitab ka saadud tulemus, et p53 aktiveerimiseks CD43 poolt on vajalik β -kateniini olemasolu (Joonis 11A ja B). Lisaks vähendab CD43 ekspressiooni inhibeerimine β -kateniini tuumalokalisatsiooni (Joonis 12, rajad 8 ja 9), mis on oluline β -kateniini funktsioneerimisel koos Tcf/Lef faktoritega transkriptsiooni reguleerimises. Seega võiks CD43 soodustada β -kateniini tuumas paiknemist ja selle kaudu Wnt-aja aktiveerumist ning kasvaja arengut. See on kooskõlas kirjanduse andmetega ja varem välja pakutud hüpoteesidega, mille kohaselt CD43 seostumine β -kateniiniga tõstab selle sihtmärkgeenide ekspressiooni ja võiks selle kaudu mängida rolli kasvaja tekkel (Andersson *et al.*, 2004). Seda toetavad veelgi meie laboris saadud tulemused, et CD43 üleekspressioon stimuleerib β -kateniin-sõltuva promootori aktiveerumist nii basaalsel kui ka võimendatud tasemel (L. Kadaja-Saarepuu avaldamata andmed).

Teisalt viitab kolooniate formeerumise inhibeerimine β -kateniini üleekspressioonil rakkudes, kus CD43 ekspressioon on vaigistatud (Joonis 10A ja B) sellele, et CD43 võiks olla üks molekulidest, mille kaudu β -kateniin rakkude jagunemist mõjutab. Sellega on vastavuses tulemus, et β -kateniin-sõltuva promootori aktiivsus väheneb rakkudes, kus CD43 ekspressioon on inhibeeritud (Joonis 13A ja B). Seega on β -kateniin-sõltuvaks maksimaalseks geeniekspressiooniks ja kasvu stimuleerimiseks vajalik CD43 olemasolu. β -kateniini siRNA inhibeeriv efekt CD43 valgu ekspressioonile (Joonis 8A ja B, rada 3) viitab võimalikule β -kateniini osalusele CD43 valgu taseme reguleerimises. Seda tulemust toetab CD43 valgu taseme tõus vastusena β -kateniini üleekspressioonile (esitamata andmed). Kuna β -kateniini siRNA efekt avaldub ka CD43 mRNA tasemel (esitamata andmed), oleks huvitav vaadata, kas β -kateniin reguleerib CD43 ekspressiooni transkriptsiooni tasandil. Need tulemused koos annaks seletuse CD43 ebanormaalse ekspressiooni kohta käärsoolekasvaja algfaasis,

kus ta võib olla oluliseks faktoriks Wnt-raja signaalide vahendajana. Käesoleva töö tulemused on kokku võetud Tabelis 6.

Tabel 6. Kokkuvõte käesoleva töö tulemustest (+ olemas; - puudub).

Funktsionaalne katse	Katsesüsteem	Staatus		Efekt	Asukoht tulemuste osas
		ARF	p53		
Kolooniate formeerumine	CD43 üleekspressioon	-	+	soodustatud	Joonis 6, lk. 33
		+	-		
		+	+	inhibeeritud	Joonis 9 ja 10, lk. 38 ja 40
	CD43 üleekspressioon, β-kat vaigistatud	+/-	-/+		
β-kat üleekspressioon, CD43 vaigistatud					
Kasvukiirus	CD43 üleekspressioon	-	+	soodustatud	Joonis 7D-F, lk. 35
Apoptoos		+	-		
		-	+	neutraalne	Joonis 7A-C, lk. 35
		+	-		
		+	+	indutseeritud	
p53 aktiveerimine	CD43 üleekspressioon, CD43 vaigistatud	+	+	neutraalne	Joonis 11, lk. 41
	CD43 üleekspressioon, β-kat vaigistatud			indutseeritud	
	CD43 üleekspressioon				
β-kateniini tuumas lokaliseerumine	CD43 vaigistatud	+/-	-/+	inhibeeritud	Joonis 12, lk. 42
	β-kat vaigistatud				
Tcf/Lef-sõltuva promootori aktiveerimine	CD43 vaigistatud	+/-	-/+	inhibeeritud	Joonis 13, lk 43
	β-kat vaigistatud				

CD43 sisaldab oma tsütoplasmaatilises osas NLS järjestust ning suudab tuuma liikuda (Andersson *et al.*, 2004). Erinevalt leukotsüütidest ongi käärsoolekasvaja rakuliinis CD43 lokaliseerimine pigem rakusisene (Sikut *et al.*, 1999). CD43 funktsiooni uurimisel tuumas on täheldatud, et endogeenne CD43 lokaliseerub tuumakehakeste sarnastesse struktuuridesse tuumas (C. Andersson'i avaldamata andmed). Erinevate tuumakehakeste seas on kirjeldatud PML-tuumakehakesi (*promyelocytic leukaemia*), mis osalevad rakkude apoptoosi ja jagunemise kontrollis (Salomoni & Pandolfi, 2002). Nendega lokaliseeruvad koos paljud valgud, teiste hulgas ka p53, Daxx ja HIPK2. HIPK2 homoloog STANK on seriin-treoniinkinaas, mis võib asuda nii tsütoplasmas kui ka tuumas ning on näidatud, et ta seostub CD43ct-ga (Wang *et al.*, 2000). Lisaks stabiliseerib ta p53, fosforüleerides Ser46 jääki ning tõstes p53 transkriptsioonilist aktiivsust (D'Orazi *et al.*, 2002). CD43 üleekspressiooni korral suureneb samuti p53 fosforüleeritus Ser46 positsioonis (L. Kadaja-Saarepuu avaldamata andmed). HIPK

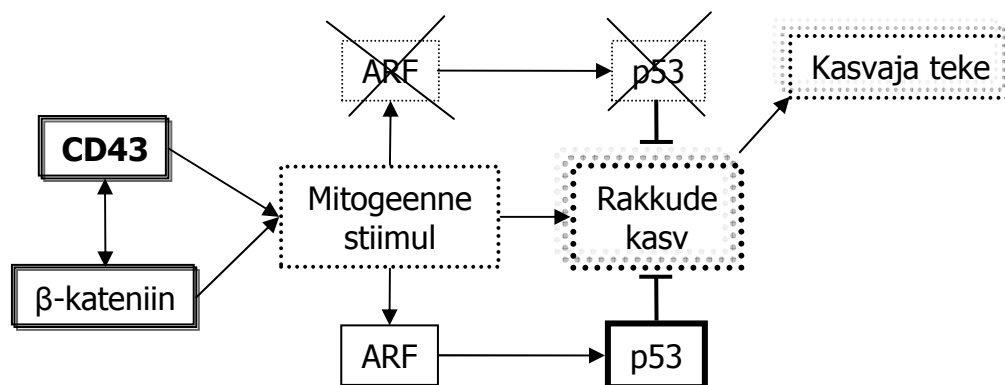
perekonna üks kinaasidest HIPK1 suurendab omakorda Fas-st lähtuva apoptoosi modulaatori Daxx transkriptsioonilist aktiivsust. (Ecsedy *et al.*, 2003). Daxx funktsioneerib nii pro- kui ka anti-apoptoosil ning seostub samuti CD43ct-ga. Samas on apoptoosi indutseerimine CD43 sidumisel mAb-ga Daxx üleekspressioonil inhibeeritud (Cermak *et al.*, 2002). Daxx rolli anti-apoptoosil kinnitavad lisaks mitmed andmed, kus on näidatud, et Daxx ekspressiooni vaigistamine suurendab rakkude apoptoosi (Chen & Chen, 2003; Michaelson & Leder, 2003). Seega on lisaks β -kateniinile CD43 interaktsioonid erinevate tuumavalkudega atraktiivseks uurimise märklauaks, et leida mehhanisme, kuidas CD43 rakkude jagunemist stimuleerib ning seeläbi kasvaja tekkel osaleb.

Kasvaja arengus on oluline, et samaaegselt jagunemise stimuleerimisega oleksid häiritud rakke apoptoosi viivad rajad. CD43 anti-apoptootilist mõju on kirjeldatud transgeensete hiirte küpsetes B-lümfotsüütides (CD43 neis tavaliselt ei esine), kus CD43 suurendab rakkude elulemust nende tundlikkuse vähendamise kaudu apoptoosi suhtes (Dragone *et al.*, 1995; Misawa *et al.*, 1996). Samuti on näidatud, et CD43 üleekspressioon inhibeerib NF κ B aktiivsust ja selle sihtmärkgeenide ekspressiooni (Laos *et al.*, 2006). NF κ B omab nii pro- kui ka antiapoptootilisi omadusi ent arvatakse, et kasvaja arengu algfaasis käitub NF κ B pigem kasvaja tekke pidurdaja kui soodustajana (Perkins, 2004). Kuna Fas sõltuvaks apoptoosiks on vajalik NF κ B aktiivsus, siis läbi NF κ B inhibeerimise võiks CD43 takistada rakkude Fas-sõltuvat apoptoosi. Seda kinnitavad meie laboris saadud tulemused, et CD43 vähendab Fas retseptori ekspressiooni ning sellest tulenevalt Fas-indutseeritud apoptoosi (J. Viil'i ja S. Laos'e avaldamata andmed). Ka β -kateniin reguleerib Fas ekspressiooni NF κ B inhibeerimise kaudu (Deng *et al.*, 2002), mis viitab sellele, et CD43 ja β -kateniini koosmõju rakkude jagunemisele võib olla seotud nende ühise apoptoosi takistava toimega.

Edasise töö eesmärgiks oleks uurida lähemalt CD43 ja β -kateniini valkude vastastikust mõju: kas suureneb valkude stabiilsus või toimub ekspressiooni soodustamine transkriptsiooni tasandil? Ühtlasi oleks oluline uurida töös kasutatud rakuliinide basaalsel Wnt-raja aktiivsust võrsetes tingimustes. See võimaldaks CD43 mõju β -kateniini-rajale rakkude taustast sõltuvalt paremini interpreteerida. Nimelt on esialgsed tulemused näidanud, et nii H1299 rakud, milles on intaktne Wnt-rada, kui ka HCT116 rakud, milles on mutantse β -kateniini tõttu konstitutiivselt aktiivne Wnt-rada, omavad sarnast basaalsel Tcf/Lef-sõltuva promootori aktiivsust. Kuna arvatakse, et β -

kateniini tegelikku aktiivsust tuumas reguleerib APC (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2003), mis esineb H1299 ja HCT116 rakuliinis wt vormina, siis oleks huvitav uurida võimalikku seost CD43 ja APC valgu vahel. Samuti tuleks uurida CD43 mõju rakkude jagunemisele ja p53 aktivatsioonile rakuliinis, mis ekspresseerib endogeenset CD43 kõrgel tasemel. Antud töös kasutatud COLO205 rakuliin ei ole selleks kõige parem, sest ta sisaldab mutantset p53, mis võib omada wt p53-st erinevaid funktsioone ning anda isegi vastupidiseid efekte rakkude jagunemise pidurdamisel. Lisaks on selgunud, et CD43 ekspressioonitase erinevates rakkudes on seotud rakkude tihedusega. Hõredalt kasvavad COLO205 rakud ekspresseerivad CD43 tunduvalt madalamal tasemel kui tihedalt kasvavad rakud, mistõttu seab see piirangud rakkude kasvu uurimiseks kasutatavate meetodite suhtes. Mõttekas oleks leida rakuliin, mis ekspresseerib CD43 kõrgel tasemel hõredates kasvutingimustes, et saaks kõrvutada üleekspressiooni tingimustes saadud tulemusi CD43 mõju kohta kolooniate tekkele füsioloogilises süsteemis.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva töö tulemused, et CD43 soodustab rakkude jagunemist ning see on vähemalt osaliselt seotud onkogeense β -kateniini rajaga. Vastusena ebanormaalsele rakkude jagunemisele indutseeritakse ARF kaudu p53 aktivatsioon ja rakkude apoptoos, mis on peamine mehhanism kasvaja tekke ärahoidmisel (Joonis 14).



Joonis 14. Mudel CD43 osaluse kohta rakkude jagunemisel ja p53 aktiveerimisel. CD43 soodustab β -kateniini transkriptsioonilist aktiivsust ja/või vahendab β -kateniinist lähtuvaid kasvusignaale, põhjustades ARF aktiveerumise, mis viib p53 stabiliseerimise ja aktiveerumiseni. Kasvajarakkudes, kus puudub kas ARF või p53, stimuleerib CD43 üleekspressioon rakkude jagunemist, viidates CD43 potentsiaalsele rollile kasvaja tekkes.

Kokkuvõte

Rakkude jagunemist stimuleerivad rajad peavad olema rangelt reguleeritud, et saaks toimuda normaalne rakkude kasv. Samas on vajalik, et üleliigsete kasvusignaalide korral jagunemine peatataks. Rakkude kasvu pidurdamine rakutsükli bloki või apoptoosi kaudu vastusena hüperproliferatsioonile toimub tuumorsupressor ARF/p53 raja kaudu, mis on oluline kasvajate ärahoidmisel. Käesolevas töös uuriti CD43 kui potentsiaalse mitogeense stiimuli mõju rakkude jagunemisele erineva ARF ja p53 staatusega rakuliinides, et saada vihjeid CD43 ebanormaalse ekspressiooni rolli kohta käärsöolekasvaja algfaasis. Paljude kasvajate nagu ka käärsöolekasvaja üheks peamiseks tekkepõhjuseks on häired β -kateniini signaalirajas, mille tulemusena β -kateniin stabiliseerub ja aktiveerib rakkude kasvu stimuleerivate geenide ekspressiooni. Kuna CD43 tsütoplasmaatiline osa seostub β -kateniiniga ja soodustab selle sihtmärkgeenide transkriptsiooni, uuriti β -kateniini potentsiaalset rolli CD43 mõjus rakkude jagunemisele.

Antud töö tulemused näitavad, et:

- CD43 üleekspressioon soodustab rakkude kasvu, mille tulemusena aktiveerub ARF/p53 rada ja rakud lähevad apoptoosi
- CD43 ekspressiooni vaigistamine vähendab rakkude kolooniate moodustumise võimet erinevates kasvajakuliinides
- Kolooniate tekke soodustamiseks ja p53 aktiveerimiseks CD43 poolt on vajalik β -kateniini olemasolu
- CD43 ekspressiooni vaigistamine inhibeerib β -kateniini soodustavat mõju kolooniate tekkele, β -kateniini tuumalokalisatsiooni ja transkriptsioonilist aktiivsust.

Seega soodustab CD43 koostöös β -kateniiniga rakkude jagunemist, mis indutseerib ARF/p53-sõltuva apoptoosiraja, mis on peamine mehhanism kasvaja tekke takistamisel. Rakkudes, kus ARF/p53 rada on rikutud, võib CD43 kõrgendatud ekspressioon läbi β -kateniini signaaliraja viia rakkude kontrollimatu jagunemiseni, mis on aluseks kasvaja tekkele.

Summary

The signaling pathways responsible for cell division must be strictly controlled to allow normal growth but to stop cells from dividing in case of hyperproliferative signals. Growth suppression either by cell cycle blockage or apoptosis in response to mitogenic stimuli is mediated by tumor suppressor ARF/p53 pathway which is important in cancer prevention. In order to obtain information about the function of abnormal expression of CD43 in early colon cancer development, the impact of CD43 as a potential mitogenic stimulus on cell growth in cell lines of different ARF and p53 expression was studied. Cancer formation in several tissues including colon is commonly caused by the disruptions in β -catenin pathway leading to the stabilisation and translocation of β -catenin protein to the nucleus where it activates the expression of genes stimulating cell growth. As the cytoplasmic domain of CD43 is known to interact with β -catenin and promote its target gene expression, it was of interest to study the potential role of β -catenin in the impact of CD43 on cell division.

The results of the current thesis show that:

- The overexpression of CD43 promotes cell growth leading to the activation of ARF/p53 pathway which results in cell death
- CD43 silencing reduces the colony forming ability of different cancer cell lines
- The colony formation and activation of p53 in response to CD43 overexpression depends on the presence of β -catenin
- CD43 silencing inhibits the promoting effect of β -catenin on colony formation, the nuclear localisation and transcriptional activity of β -catenin.

It concludes that CD43 promotes cell growth in cooperation with β -catenin leading to the induction of ARF/p53-dependent apoptosis, which is the main mechanism of defence against malignant growth. In cells lacking either ARF or p53 expression, the higher expression of CD43 together with β -catenin could cause the uncontrolled proliferation of cells which gives rise to cancer development.

Kasutatud kirjandus

- Ababneh, M, Gotz, C and Montenarh, M (2001). Downregulation of the cdc2/cyclin B protein kinase activity by binding of p53 to p34(cdc2). *Biochem Biophys Res Commun* 283, 507-12.
- Abdel-Fattah, G, Yoffe, B, Krishnan, B, Khaoustov, V and Itani, K (2000). MDM2/p53 protein expression in the development of colorectal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 4, 109-14.
- Abdulkarim, B, Sabri, S, Deutsch, E, Chagraoui, H, Maggiora, L, Thierry, J, Eschwege, F, Vainchenker, W, Chouaib, S and Bourhis, J (2002). Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers. *Oncogene* 21, 2334-46.
- Amano, J, Morimoto, C and Irimura, T (2001). Intestinal epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans. *Microbes Infect* 3, 723-8.
- Andersson, CX, Fernandez-Rodriguez, J, Laos, S, Baeckstrom, D, Haass, C and Hansson, GC (2005). Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochem J* 387, 377-84.
- Andersson, CX, Fernandez-Rodriguez, J, Laos, S, Sikut, R, Sikut, A, Baeckstrom, D and Hansson, GC (2004). CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 12-7.
- Appella, E (2001). Modulation of p53 function in cellular regulation. *Eur J Biochem* 268, 2763.
- Appella, E and Anderson, CW (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268, 2764-72.
- Ardman, B, Sikorski, MA and Staunton, DE (1992). CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5001-5.
- Baeckstrom, D (1997). Post-translational fate of a mucin-like leukocyte sialoglycoprotein (CD43) aberrantly expressed in a colon carcinoma cell line. *J Biol Chem* 272, 11503-9.
- Baeckstrom, D, Zhang, K, Asker, N, Ruetschi, U, Ek, M and Hansson, GC (1995). Expression of the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43 by a colon carcinoma cell line. *J Biol Chem* 270, 13688-92.
- Baker, SJ, Markowitz, S, Fearon, ER, Willson, JK and Vogelstein, B (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-5.
- Baldus, SE, Schneider, PM, Monig, SP, Zirbes, TK, Fromm, S, Meyer, W, Glossmann, J, Schuler, S, Thiele, J, Holscher, AH and Dienes, HP (2001). p21/waf1/cip1 in gastric cancer: associations with histopathological subtypes, lymphonodal metastasis, prognosis and p53 status. *Scand J Gastroenterol* 36, 975-80.
- Bazil, V, Brandt, J, Tsukamoto, A and Hoffman, R (1995). Apoptosis of human hematopoietic progenitor cells induced by crosslinking of surface CD43, the major sialoglycoprotein of leukocytes. *Blood* 86, 502-11.
- Bazil, V and Strominger, JL (1993). CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3792-6.
- Bates, S, Phillips, A, Clark, P, Stott, F, Peters, G, Ludwig, R and Vousden, K (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
- Baum, LG, Pang, M, Perillo, NL, Wu, T, Delegeane, A, Uittenbogaart, CH, Fukuda, M and Seilhamer, JJ (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 181, 877-87.
- Beachy, PA, Karhadkar, SS and Berman, DM (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432, 324-31.
- Behrens, J and Lustig, B (2004). The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 48, 477-87.
- Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brookes, S, Rowe, J, Ruas, M, Llanos, S, Clark, P, Lomax, M, James, M, Vatcheva, R, Bates, S, Vousden, K, Parry, D, Gruis, N, Smit, N, Bergman, W and Peters, G (2002). INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO J* 21, 2936-2945.
- Brown, TJ, Shuford, WW, Wang, WC, Nadler, SG, Bailey, TS, Marquardt, H and Mittler, RS (1996). Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem* 271, 27686-95.
- Bulavin, D, Saito, S, Hollander, M, Sakaguchi, K, Anderson, C, Appella, E and Fornace, AJ (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 18, 6845-6854.

- Carlsson, SR and Fukuda, M (1986). Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem* 261, 12779-86.
- Cayrol, C, Knibiehler, M and Ducommun, B (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16, 311-20.
- Cermak, L, Simova, S, Pintzas, A, Horejsi, V and Andera, L (2002). Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J Biol Chem* 277, 7955-61.
- Chen, LY and Chen, JD (2003). Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* 23, 7108-21.
- Chin, L, Pomerantz, J and DePincho, R (1998). The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci.* 23, 291-296.
- Chipuk, KT, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* Vol 303, 1010-1014.
- Clarke, A, Purdie, C, Harrison, D, Morris, R, Bird, C, Hooper, M and Wyllie, A (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways *Nature* 362, 849-52.
- Czosnek, H, Bienz, B, Givol, D, Zakut-Houri, R, Pravtcheva, D, Ruddle, F and Oren, M (1984). The gene and the pseudogene for mouse p53 cellular tumor antigen are located on different chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1638-40.
- Cyster, J, Somoza, C, Killeen, N and Williams, AF (1990). Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *Eur J Immunol* 20, 875-81.
- Cyster, JG, Shotton, DM and Williams, AF (1991). The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *Embo J* 10, 893-902.
- Da Silva, N, Bharti, A and Shelley, CS (2002). hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter. *Blood* 100, 3536-44.
- Damalas, A, Kahan, S, Shtutman, M, Ben-Ze'ev, A and Oren, M (2001). Dereglated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *Embo J* 20, 4912-22.
- Dang, CV, Resar, LM, Emison, E, Kim, S, Li, Q, Prescott, JE, Wonsey, D and Zeller, K (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 253, 63-77.
- de Stanchina, E, McCurrach, ME, Zindy, F, Shieh, SY, Ferbeyre, G, Samuelson, AV, Prives, C, Roussel, MF, Sherr, CJ and Lowe, SW (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-42.
- DeLeo, AB, Jay, G, Appella, E, Dubois, GC, Law, LW and Old, LJ (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2420-4.
- Deng, J, Miller, SA, Wang, HY, Xia, W, Wen, Y, Zhou, BP, Li, Y, Lin, SY and Hung, MC (2002). beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2, 323-34.
- Di Stefano, V, Rinaldo, C, Sacchi, A, Soddu, S and D'Orazi, G (2004). Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 293, 311-20.
- D'Orazi, G, Cecchinelli, B, Bruno, T, Manni, I, Higashimoto, Y, Saito, S, Gostissa, M, Coen, S, Marchetti, A, Del Sal, G, Piaggio, G, Fanciulli, M, Appella, E and Soddu, S (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4, 11-9.
- Dragone, LL, Barth, RK, Sitar, KL, Disbrow, GL and Frelinger, JG (1995). Disregulation of leukosialin (CD43, Ly48, sialophorin) expression in the B-cell lineage of transgenic mice increases splenic B-cell number and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 626-30.
- Drew, E, Merzaban, JS, Seo, W, Ziltener, HJ and McNagny, KM (2005). CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity* 22, 43-57.
- Dutta, A, Ruppert, J, Aster, J and Winchester, E (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 365, 79-82.
- Ecsedy, JA, Michaelson, JS and Leder, P (2003). Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 23, 950-60.
- Eischen, CM, Weber, JD, Roussel, MF, Sherr, CJ and Cleveland, JL (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in myc-induced lymphomagenesis [In Process Citation]. *Genes Dev* 13, 2658-69.

- Elbashir, SM, Harborth, J, Lendeckel, W, Yalcin, A, Weber, K and Tuschl, T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- El-Deiry, WS, Kern, SE, Pietenpol, JA, Kinzler, KW and Vogelstein, B (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* 1, 45-9.
- Eliyahu, D, Michalovitz, D, Eliyahu, S, Pinhasi-Kimhi, O and Oren, M (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8763-7.
- Esteller, M, Tortola, S, Toyota, M, Capella, G, Peinado, MA, Baylin, SB and Herman, JG (2000). Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60, 129-33.
- Farokhzad, OC, Teodoridis, JM, Park, H, Arnaout, MA and Shelley, CS (2000). CD43 gene expression is mediated by a nuclear factor which binds pyrimidine-rich single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 28, 2256-67.
- Fearnhead, NS, Britton, MP and Bodmer, WF (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10, 721-33.
- Fernandez-Cabezudo, MJ, Vijayasathy, C, Pflugh, DL, Bothwell, AL and al-Ramadi, BK (2004). Evidence for a dual pathway of activation in CD43-stimulated Th2 cells: differential requirement for the Lck tyrosine kinase. *Int Immunol* 16, 1215-23.
- Fernandez-Rodriguez, J, Andersson, CX, Laos, S, Baeckstrom, D, Sikut, A, Sikut, R and Hansson, GC (2002). The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol* 23, 193-201.
- Finlay, CA, Hinds, PW and Levine, AJ (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-93.
- Freedman, DA and Levine, AJ (1999). Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein--thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 59, 1-7.
- Fridman, J and Lowe, S (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030-9040.
- Fukuda, M (1991). Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy. *Glycobiology* 1, 347-56.
- Fukumoto, S, Hsieh, CM, Maemura, K, Layne, MD, Yet, SF, Lee, KH, Matsui, T, Rosenzweig, A, Taylor, WG, Rubin, JS, Perrella, MA and Lee, ME (2001). Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem* 276, 17479-83.
- Fukuoka, M, Fukudome, K, Yamashita, Y, Tokushima, M, Miyake, K and Kimoto, M (2000). Antiadhesive function of 130-kd glycoform of CD43 expressed in CD4 T- lymphocyte clones and transfectant cell lines. *Blood* 96, 4267-75.
- Giacca, AJ and Kastan, MB (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12, 2973-83.
- Giannakakou, P, Nakano, M, Nicolaou, KC, O'Brate, A, Yu, J, Blagosklonny, MV, Greber, UF and Fojo, T (2002). Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10855-60.
- Giannakakou, P, Poy, G, Zhan, Z, Knutsen, T, Blagosklonny, MV and Fojo, T (2000). Paclitaxel selects for mutant or pseudo-null p53 in drug resistance associated with tubulin mutations in human cancer. *Oncogene* 19, 3078-85.
- Giles, RH, van Es, JH and Clevers, H (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653, 1-24.
- Ginsberg, D, Mechta, F, Yaniv, M and Oren, M (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9979-83.
- Gorina, S and Pavletich, N (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 274, 1001-5.
- Gostissa, M, Hengstermann, A, Fogal, V, Sandy, P, Schwarz, SE, Scheffner, M and Del Sal, G (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18, 6462-71.
- Harris, SL and Levine, AJ (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899-908.
- Harvey, M, Sands, A, Weiss, R, Hegi, M, Wiseman, R, Pantazis, P, Giovannella, B, Tainsky, M, Bradley, A and Donehower, L (1993). In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 8, 2457-67.
- He, TC, Sparks, AB, Rago, C, Hermeking, H, Zawel, L, da Costa, LT, Morin, PJ, Vogelstein, B and Kinzler, KW (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-12.
- He, YW and Bevan, MJ (1999). High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis. *J Exp Med* 190, 1903-8.
- Hinds, P, Finlay, C and Levine, A (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* 63, 739-46.

- Hoffman, WH, Biade, S, Zilfou, JT, Chen, J and Murphy, M (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277, 3247-57.
- Honda, R and Yasuda, H (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* 18, 22-7.
- Horikoshi, N, Usheva, A, Chen, J, Levine, AJ, Weinmann, R and Shenk, T (1995). Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 15, 227-34.
- Hupp, TR and Lane, DP (1994). Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr. Biol.* 4, 865-75.
- Iwai, A, Marusawa, H, Matsuzawa, S, Fukushima, T, Hijikata, M, Reed, JC, Shimotohno, K and Chiba, T (2004). Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates beta-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene* 23, 7593-600.
- Jeffrey, PD, Gorina, S and Pavletich, NP (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498-502.
- Jenkins, J, Chumakov, P, Addison, C, Stürzbecher, H and Wade-Evans, A (1988). Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 62, 3903-6.
- Jones, SN, Roe, AE, Donehower, LA and Bradley, A (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-8.
- Kadaja, L, Laos, S and Maimets, T (2004). Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF. *Oncogene* 23, 2523-30.
- Kamijo, T, Weber, JD, Zambetti, G, Zindy, F, Roussel, MF and Sherr, CJ (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8292-7.
- Kastan, MB, Zhan, Q, El-Deiry, WS, Carrier, F, Jacks, T, Walsh, WV, Plunkett, BS, Vogelstein, B and Fornace, AJJ (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-97.
- Kikuchi, A (2000). Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 243-8.
- Kim, HJ, Park, HJ, Park, WS and Bae, Y (2006). CD43 cross-linking increases the Fas-induced apoptosis through induction of Fas aggregation in Jurkat T-cells. *Exp Mol Med* 38, 357-63.
- Ko, LJ and Prives, C (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes & Dev.* 10, 1054-72.
- Korinek, V, Barker, N, Morin, PJ, van Wichen, D, de Weger, R, Kinzler, KW, Vogelstein, B and Clevers, H (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784-7.
- Kubbutat, MH, Jones, SN and Vousden, KH (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kudo, S (1998). Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* 18, 5492-9.
- Kudo, S and Fukuda, M (1995). Tissue-specific transcriptional regulation of human leukosialin (CD43) gene is achieved by DNA methylation. *J Biol Chem* 270, 13298-302.
- Kudo, S and Fukuda, M (1994). Transcriptional activation of human leukosialin (CD43) gene by Sp1 through binding to a GGGTGG motif. *Eur J Biochem* 223, 319-27.
- Laos, S, Baeckstrom, D and Hansson, GC (2006). Inhibition of NF-kappaB activation and chemokine expression by the leukocyte glycoprotein, CD43, in colon cancer cells. *Int J Oncol* 28, 695-704.
- Lavon, I, Pikarsky, E, Gutkovich, E, Goldberg, I, Bar, J, Oren, M and Ben-Neriah, Y (2003). Nuclear factor-kappaB protects the liver against genotoxic stress and functions independently of p53. *Cancer Res* 63, 25-30.
- Levi, E, Stryker, S and Rao, M (1996). p53 Protein overexpression in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis: is it an early or late event? . *Am J Gastroenterol* 91, 11-4.
- Levine, AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31.
- Linzer, D and Levine, A (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 79, 43-52.
- Liu, J, Stevens, J, Rote, CA, Yost, HJ, Hu, Y, Neufeld, KL, White, RL and Matsunami, N (2001). Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* 7, 927-36.
- Logan, CY and Nusse, R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Lowe, SW and Sherr, CJ (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13, 77-83.

- Lowe, S, Schmitt, E, Smith, S, Osborne, B and Jacks, T (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes *Nature* 362, 847-9.
- Lu, H and Levine, AJ (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5154-8.
- Lustig, B and Behrens, J (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 199-221.
- Maecker, HL, Koumenis, C and Giaccia, AJ (2000). p53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance. *Cancer Res* 60, 4638-44.
- Manjunath, N, Correa, M, Ardman, M and Ardman, B (1995). Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* 377, 535-8.
- Manjunath, N, Johnson, RS, Staunton, DE, Pasqualini, R and Ardman, B (1993). Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *J Immunol* 151, 1528-34.
- Mann, B, Gelos, M, Siedow, A, Hanski, ML, Gratchev, A, Ilyas, M, Bodmer, WF, Moyer, MP, Riecken, EO, Buhr, HJ and Hanski, C (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1603-8.
- Mazars, R, Pujol, P, Maudelonde, T, Jeanteur, P and Theillet, C (1991). p53 mutations in ovarian cancer: a late event? *Oncogene* 6, 1685-90.
- Matsumoto, M, Shigeta, A, Furukawa, Y, Tanaka, T, Miyasaka, M and Hirata, T (2007). CD43 collaborates with P-selectin glycoprotein ligand-1 to mediate E-selectin-dependent T cell migration into inflamed skin. *J Immunol* 178, 2499-506.
- Matsumoto, M, Atarashi, K, Umemoto, E, Furukawa, Y, Shigeta, A, Miyasaka, M and Hirata, T (2005). CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells. *J Immunol* 175, 8042-50.
- Mattioli, I, Dittrich-Breiholz, O, Livingstone, M, Kracht, M and Schmitz, ML (2004). Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes. *Blood* 104, 3302-4.
- Mayo, L and Donner, D (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 27, 462-467.
- Michaelson, JS and Leder, P (2003). RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* 116, 345-52.
- Midgley, CA, Desterro, JM, Saville, MK, Howard, S, Sparks, A, Hay, RT and Lane, DP (2000). An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* 19, 2312-23.
- Mihara, M, Erster, S, Zaika, A, Petrenko, O, Chittenden, T, Pancoska, P and Moll, U (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.
- Misawa, Y, Nagaoka, H, Kimoto, H, Ishii, Y, Kitamura, K, Tsunetsugu-Yokota, Y, Shibuya, M and Takemori, T (1996). CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. *Eur J Immunol* 26, 2573-81.
- Miyashita, T, Krajewski, S, Krajewska, M, Wang, HG, Lin, HK, Liebermann, DA, Hoffman, B and Reed, JC (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-805.
- Montes de Oca Luna, R, Wagner, DS and Lozano, G (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-6.
- Moon, RT, Kohn, AD, De Ferrari, GV and Kaykas, A (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5, 691-701.
- Morin, PJ (1999). beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 21, 1021-30.
- Moroni, MC, Hickman, ES, Denchi, EL, Caprara, G, Colli, E, Cecconi, F, Muller, H and Helin, K (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-8.
- Muller, M, Wilder, S, Bannasch, D, Israeli, D, Lehlbach, K, Li-Weber, M, Friedman, SL, Galle, PR, Stremmel, W, Oren, M and Krammer, PH (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188, 2033-45.
- Nakano, H, Kohara, M and Shinohara, K (2001). Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res* 306, 101-6.
- Okorokov, AL and Milner, J (1997). Proteolytic cleavage of p53: a model for the activation of p53 in response to DNA damage. *Oncol Res.* 9, 267-73.
- Oliner, JD, Pietenpol, JA, Thiagalingam, S, Gyuris, J, Kinzler, KW and Vogelstein, B (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-60.
- Oren, M (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-42.

- Ostberg, JR, Barth, RK and Frelinger, JG (1998). The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol Today* 19, 546-50.
- Ostberg, JR, Dragone, LL, Driskell, T, Moynihan, JA, Phipps, R, Barth, RK and Frelinger, JG (1996). Disregulated expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency. *J Immunol* 157, 4876-84.
- Pallant, A, Eskenazi, A, Mattei, MG, Fournier, RE, Carlsson, SR, Fukuda, M and Frelinger, JG (1989). Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1328-32.
- Park, WS, Chae, JS, Jung, KC, Choi, WJ, Kook, MC and Bae, Y (2004). Production and the characterization of monoclonal antibody against CD43, K06. *Tissue Antigens* 63, 46-53.
- Pedraza-Alva, G, Merida, LB, Burakoff, SJ and Rosenstein, Y (1998). T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J Biol Chem* 273, 14218-24.
- Pedraza-Alva, G, Merida, LB, Burakoff, SJ and Rosenstein, Y (1996). CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J Biol Chem* 271, 27564-8.
- Peifer, M and Polakis, P (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287, 1606-9.
- Perkins, ND (2004). NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* 14, 64-9.
- Piller, V, Piller, F and Fukuda, M (1989). Phosphorylation of the major leukocyte surface sialoglycoprotein, leukosialin, is increased by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 264, 18824-31.
- Pimenidou, A, Madden, L, Topping, K, Smith, K, Monson, J and Greenman, J (2004). Novel CD43 specific phage antibodies react with early stage colorectal tumours. *Oncol Rep* 11, 327-331.
- Polakis, P (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14, 1837-51.
- Prives, C and Hall, PA (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-26.
- Radfar, A, Unnikrishnan, I, Lee, HW, DePinho, RA and Rosenberg, N (1998). p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13194-9.
- Radtke, F and Clevers, H (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-9.
- Remold-O'Donnell, E, Zimmerman, C, Kenney, D and Rosen, FS (1987). Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 70, 104-109.
- Reya, T, Duncan, AW, Ailles, L, Domen, J, Scherer, DC, Willert, K, Hintz, L, Nusse, R and Weissman, IL (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-14.
- Rosenstein, Y, Park, JK, Hahn, WC, Rosen, FS, Bierer, BE and Burakoff, SJ (1991). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354, 233-5.
- Rosenstein, Y, Santana, A and Pedraza-Alva, G (1999). CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol Res* 20, 89-99.
- Rosin-Arbesfeld, R, Cliffe, A, Brabletz, T and Bienz, M (2003). Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *Embo J* 22, 1101-13.
- Rowland, B, Denissov, S, Douma, S, Stunnenberg, H, Bernards, R and Peeper, D (2002). E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest. *Cancer Cell* 2, 55-65.
- Salomoni, P and Pandolfi, PP (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108, 165-70.
- Santamaria, M, Lopez-Beltran, A, Toro, M, Pena, J and Molina, IJ (1996). Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells. *Cancer Res* 56, 3526-9.
- Santana, MA, Pedraza-Alva, G, Olivares-Zavaleta, N, Madrid-Marina, V, Horejsi, V, Burakoff, SJ and Rosenstein, Y (2000). CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275, 31460-8.
- Sax, J, Fei, P, Murphy, M, Bernhard, E, Korsmeyer, S and El-Deiry, W (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4, 842-849.
- Schmid, K, Hediger, MA, Brossmer, R, Collins, JH, Haupt, H, Marti, T, Offner, GD, Schaller, J, Takagaki, K, Walsh, MT and et al. (1992). Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 663-7.

- Schreiber, M, Kolbus, A, Piu, F, Szabowski, A, Mohle-Steinlein, U, Tian, J, Karin, M, Angel, P and Wagner, EF (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 13, 607-19.
- Segditsas, S and Tomlinson, I (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531-7.
- Serrador, JM, Nieto, M, Alonso-Lebrero, JL, del Pozo, MA, Calvo, J, Furthmayr, H, Schwartz-Albiez, R, Lozano, F, Gonzalez-Amaro, R, Sanchez-Mateos, P and Sanchez-Madrid, F (1998). CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91, 4632-44.
- Serrano, M, Lin, A, McCurrach, M, Beach, D and Lowe, S (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Sharpless, NE, Ramsey, MR, Balasubramanian, P, Castrillon, DH and DePinho, RA (2004). The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-85.
- Shaulsky, G, Goldfinger, N, Ben-Ze'ev, A and Rotter, V (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6565-77.
- Shaw, P, Freeman, J, Bovey, R and Iggo, R (1996). Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12, 921-30.
- Shelley, CS, Da Silva, N and Teodoridis, JM (2001). During U937 monocytic differentiation repression of the CD43 gene promoter is mediated by the single-stranded DNA binding protein Pur alpha. *Br J Haematol* 115, 159-66.
- Sherr, CJ (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 6, 663-73.
- Sherr, CJ, Bertwistle, D, W, DENB, Kuo, ML, Sugimoto, M, Tago, K, Williams, RT, Zindy, F and Roussel, MF (2005). p53-Dependent and -independent functions of the Arf tumor suppressor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 129-37.
- Sherr, CJ and Weber, JD (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-9.
- Sherr, CJ (1998). Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* 12, 2984-91.
- Sikut, R, Andersson, CX, Sikut, A, Fernandez-Rodriguez, J, Karlsson, NG and Hansson, GC (1999). Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. *Int J Cancer* 82, 52-8.
- Sikut, R, Nilsson, O, Baeckstrom, D and Hansson, GC (1997). Colon adenoma and cancer cells aberrantly express the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 612-6.
- Silverman, LB, Wong, RC, Remold-O'Donnell, E, Vercelli, D, Sancho, J, Terhorst, C, Rosen, F, Geha, R and Chatila, T (1989). Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *J Immunol* 142, 4194-200.
- Smith, ML, Chen, IT, Zhan, Q, Bae, I, Chen, CY, Gilmer, TM, Kastan, MB, O'Connor, PM and Fornace, AJJ (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266, 1376-80.
- Soengas, MS, Alarcon, RM, Yoshida, H, Giaccia, AJ, Hakem, R, Mak, TW and Lowe, SW (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284, 156-9.
- Somasundaram, K (2000). Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* 5, D424-37.
- Soussi, T (1997). [Tumor suppressor p53 gene: a potential target for cancer therapy?]. *Bull Cancer* 84, 753-6.
- Soussi, T and May, P (1996). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol.* 260, 623-37.
- Soussi, T, Caron de Fromentel, C and May, P (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-52.
- Stockl, J, Majdic, O, Kohl, P, Pickl, WF, Menzel, JE and Knapp, W (1996). Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J Exp Med* 184, 1769-79.
- Stockton, BM, Cheng, G, Manjunath, N, Ardman, B and von Andrian, UH (1998). Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* 8, 373-81.
- Stott, FJ, Bates, S, James, MC, McConnell, BB, Starborg, M, Brookes, S, Palmero, I, Ryan, K, Hara, E, Vousden, KH and Peters, G (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J* 17, 5001-14.
- Zamzami, N and Kroemer, G (2003). Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization--the (w)hole story? *Curr Biol* 13, R71-3.

- Zhan, Q, Antinore, MJ, Wang, XW, Carrier, F, Smith, ML, Harris, CC and Fornace, AJ, Jr. (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892-900.
- Zhang, K, Baeckstrom, D, Brevinge, H and Hansson, GC (1997). Comparison of sialyl-Lewis a-carrying CD43 and MUC1 mucins secreted from a colon carcinoma cell line for E-selectin binding and inhibition of leukocyte adhesion. *Tumour Biol* 18, 175-87.
- Zindy, F, Eischen, CM, Randle, DH, Kamijo, T, Cleveland, JL, Sherr, CJ and Roussel, MF (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-33.
- Ziprin, P, Alkhamesi, NA, Ridgway, PF, Peck, DH and Darzi, AW (2004). Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumour-mesothelial cell adhesion. *Biol Chem* 385, 755-61.
- Tetsu, O and McCormick, F (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-6.
- Tong, J, Allenspach, EJ, Takahashi, SM, Mody, PD, Park, C, Burkhardt, JK and Sperling, AI (2004). CD43 regulation of T cell activation is not through steric inhibition of T cell-APC interactions but through an intracellular mechanism. *J Exp Med* 199, 1277-83.
- Walker, J and Green, JM (1999). Structural requirements for CD43 function. *J Immunol* 162, 4109-14.
- Walker, KK and Levine, AJ (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15335-40.
- Wang, W, Link, V and Green, JM (2000). Identification and cloning of a CD43-associated serine/threonine kinase. *Cell Immunol* 205, 34-9.
- Wang, X, Gibson, M, Vermeulen, W, Yeh, H, Forrester, K, Stürzbecher, H, Hoeijmakers, J and Harris, C (1995). Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res.* 55, 6012-6.
- Weber, JD, Taylor, LJ, Roussel, MF, Sherr, CJ and Bar-Sagi, D (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-26.
- Weber, S, Babina, M, Hermann, B and Henz, BM (1997). Leukosialin (CD43) is proteolytically cleaved from stimulated HMC-1 cells. *Immunobiology* 197, 82-96.
- Verma, UN, Surabhi, RM, Schmaltieg, A, Becerra, C and Gaynor, RB (2003). Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 1291-300.
- Willert, K and Nusse, R (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8, 95-102.
- Vogelstein, B, Lane, D and Levine, AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-10.
- Xiong, Y, Hannon, GJ, Zhang, H, Casso, D, Kobayashi, R and Beach, D (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature* 366, 701-4.
- Yonemura, S, Hirao, M, Doi, Y, Takahashi, N, Kondo, T and Tsukita, S (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140, 885-95.
- Yonemura, S, Nagafuchi, A, Sato, N and Tsukita, S (1993). Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 120, 437-49.
- Yonish-Rouach, E, Resnitzky, D, Lotem, J, Sachs, L, Kimchi, A and Oren, M (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-7.

Tänuavaldused

Tänan oma juhendajaid Lilian Kadaja-Saarepuu'd, kes on olnud abivalmis ja väga sõbralik nii tööalaselt kui ka inimesena üldse, ning Toivo Maimets'a rahalise toetuse eest. Janeli, Anna ja Marko: aitäh teile laheda laboriõhkkonna loomise eest meie pisikeses ruumis ka kõige argihallimatel päevadel. Tänud teistele rakubioloogidele: Signele igikestva võime eest kõigi jaoks vajalikul momendil aega leida, Arnoldile kasulike nõuannete, alati olemasolemise ja muheduse eest, ja kõigile teistele väikese rakubioloogidele omase kiiksu eest, mis on teaduse tegemisele mõnusa roosaka varjundi lisanud. Samuti aitäh Madisele toetuse ja kannatlikkuse eest ning õele Annele ja Lilitile õhtuste naistejuttude eest, mis on vaimule vabastavalt mõjunud.